

ALESSANDRA FOLADOR

**AVALIAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS
REPRODUTIVOS DE RATOS *WISTAR* (*Rattus norvegicus*)
SUBMETIDOS A TRATAMENTO COM AVERMECTINAS**

Dissertação apresentada como requisito
parcial à obtenção do grau de Mestre.
Curso de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias, Setor de Ciências Agrárias,
Universidade Federal do Paraná.

Orientador:
Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes

CURITIBA
1999



PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa de Tese da Candidata ao Título de Mestre em Ciências Veterinárias, Área Patologia Veterinária ALESSANDRA FOLADOR após a realização desse evento, exarou o seguinte Parecer:

- 1) A Tese, intitulada **“AVALIAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS REPRODUTIVOS DE RATOS WISTAR (*Mus norvegicus albinus*) SUBMETIDO A TRATAMENTO COM AVERMECTINAS”** foi considerada, por todos os Examinadores, como um louvável trabalho, encerrando resultados que representam importante progresso na área de sua pertinência.
- 2) A Candidata se houve muito bem durante a Defesa de Tese, respondendo a todas as questões que foram colocadas.

Assim, a Comissão Examinadora, ante os méritos demonstrados pela Candidata, atribuiu o conceito "A" concluindo que faz jus ao Título de Mestre em Ciências Veterinárias, Área de Patologia Veterinária.

Curitiba, 17 de dezembro de 1999.

Prof. Dr. LUIZ CLAUDIO FERNANDES
Presidente/Orientador

Prof. Dr. LUIZ ERNANDES KOZICKI
Membro

Profa. Dra. ANETE CURTE FERRAZ
Membro

vivo della mia morte e, se ben guardo,
felice vivo d'infelice sorte; e chi viver non
sa d'angoscia e morte, nel foco venga,
ov'io mi struggo e ardo.

Michelangelo Buonarroti, 1532.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. *Luiz Cláudio Fernandes*,

a oportunidade, a orientação, a disciplina, o altruísmo, a amizade, o apoio, a confiança, a persistência e a incansável paciência na condução deste trabalho.

Aos pessoal do Laboratório de Metabolismo Celular,

Oswaldo, Sandro, Débora, Valéria, Patrícia, Cathia, Daniele, Heloísa e Ricardo,

a força, o auxílio e a união.

À amiga *Claudia Consuelo Ota*,

a ajuda e cumplicidade.

À amiga-irmã *Alessandra Quaggio Augusto*,

o companheirismo.

À amiga Prof^a. Dr^a. *Clotilde de Lourdes Branco Germiniani*,

o apoio sempre presente.

Ao Prof. Dr. *Metry Bacila*, pessoa ímpar de personalidade marcante e inesquecível,

o exemplo de sabedoria.

Ao Laboratório de Medicina Nuclear do Hospital de Clínicas da UFPR, à técnica *Flavia*, a realização das dosagens hormonais.

À Prof^a. Dr^a. *Patrícia Gama*,

a utilização de seu laboratório – ICB-USP.

Ao Departamento de Fisiologia, Prof^a. *Ana Lúcia Tararhuch*, Prof^a. *Ana Maria Filadelfi*,

Prof^a. *Ana Vitória F. da Silva*, Prof. *Amauri Bartoszeck*, Prof^a. Dr^a. *Anete Curte Ferraz*,

Prof. *Carlos Damiani*, Prof^a. Dr^a. *Carolina de Arruda Freire*, Prof^a. *Claudia Maria Sallai*,

Prof^a. Dr^a. *Ilana Kassouf Silva*, Prof^a. Dr^a. *Marisa Fernandes de Castilho*, Prof^a. *Raquel*

Thomal, Prof. Dr. *Ricardo Fernandez Peres*, Prof^a. *Rosana Nogueira de Moraes*, Prof.

Dr. *Rosalvo Tadeu Fogaça*, *Maria Betti S. da Costa* e *Maria Cristina B. Leal*,

a acolhida marcante.

Ao Laboratório de Histotecnologia, Sr. *Herculano S. do reis Filho - Nino*,

o auxílio na preparação do material histológico.

À bibliotecária do SCB, *Mariza Kampfert*,

a atenção e gentileza.

Aos Laboratórios Pfizer Ltda – Divisão Agripecuária, em especial ao Dr. *Lauro Caproni*,

a gentileza e atenção no atendimento e em ceder DECTOMAX®.

Aos Laboratórios Schering-Plough,

a gentileza em ceder SUPRAMEC®.

Aos Laboratórios Hoechst Roussel Vet.,

a gentileza em ceder AVOTAN*.

Ao CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, à CAPES

– Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, à UFPR

– Universidade Federal do Paraná e ao CGCVC – Curso de Pós-Graduação em

Ciências Veterinárias,

a possibilidade de realização desta obra.

SUMÁRIO

| | |
|--|------|
| LISTA DE TABELAS..... | viii |
| LISTA DE FIGURAS..... | ix |
| RESUMO..... | x |
| ABSTRACT..... | xi |
| INTRODUÇÃO | 1 |
| AVERMECTINAS | 3 |
| DEFINIÇÃO | 3 |
| MECANISMO DE AÇÃO DAS AVERMECTINAS..... | 5 |
| Mecanismo de ação das avermectinas em animais invertebrados | 7 |
| Mecanismo de ação das avermectinas em animais vertebrados..... | 8 |
| FARMACOCINÉTICA | 11 |
| SEGURANÇA..... | 12 |
| TOXICIDADE..... | 13 |
| Intoxicação aguda e subcrônica..... | 13 |
| Toxicidade no desenvolvimento | 15 |
| Carcinogenicidade e teratogenicidade | 16 |
| Toxicidade reprodutiva..... | 17 |
| ESTRUTURA QUÍMICA DAS AVERMECTINAS | 18 |
| ANTÍDOTOS | 20 |
| AVERMECTINAS UTILIZADAS NESTE ESTUDO | 21 |
| ABAMECTINA | 21 |
| DORAMECTINA..... | 21 |
| IVERMECTINA..... | 22 |
| ESTRUTURA QUÍMICA DAS AVERMECTINAS UTILIZADAS NESTE ESTUDO | 23 |
| OBJETIVO | 24 |
| JUSTIFICATIVAS | 24 |
| MATERIAL E MÉTODOS | 26 |
| ANIMAIS..... | 26 |
| REAGENTES, ENZIMAS E HORMÔNIOS | 26 |
| PLANO EXPERIMENTAL | 28 |
| PROTOCOLO DE TRATAMENTO | 28 |
| PROTOCOLO DE ESTUDO..... | 29 |
| AVALIAÇÃO DOS GRUPOS | 29 |
| PESAGEM DOS ANIMAIS..... | 29 |
| COLHEITA DOS ESPERMATOZÓIDES..... | 29 |
| COLHEITA DO SANGUE | 30 |
| COLHEITA E PESAGEM DO TESTÍCULO, ÓRGÃOS ACESSÓRIOS E HIPÓFISE..... | 30 |
| PRODUÇÃO DE TESTOSTERONA <i>IN VITRO</i> | 31 |
| DETERMINAÇÃO DA GLICEMIA | 31 |
| DOSAGEM HORMONAL..... | 32 |
| MOTILIDADE E VIGOR ESPERMÁTICO | 33 |
| MORFOLOGIA ESPERMÁTICA..... | 33 |
| DOSAGEM DE PROTEÍNAS TOTAIS DO CONTEÚDO EPIDIDIMÁRIO | 34 |

| | |
|--|----|
| ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA- DODECIL SULFATO DE SÓDIO (SDS-PAGE) | 35 |
| HISTOLOGIA DO PARÊNQUIMA TESTICULAR..... | 36 |
| ANÁLISE ESTATÍSTICA | 36 |
| RESULTADOS | 37 |
| DETERMINAÇÃO DA EVOLUÇÃO DA MASSA CORPORAL | 37 |
| DETERMINAÇÃO DA PESAGEM DOS TESTÍCULOS, ÓRGÃOS ACESSÓRIOS E HIPÓFISE..... | 37 |
| DETERMINAÇÃO DA GLICEMIA | 41 |
| DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO HORMONAL CIRCULANTE | 41 |
| Testosterona, LH e FSH | 41 |
| Produção de testosterona <i>in vitro</i> | 41 |
| DETERMINAÇÃO DA MOTILIDADE E VIGOR ESPERMÁTICO | 47 |
| DETERMINAÇÃO DA MORFOLOGIA ESPERMÁTICA..... | 47 |
| DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE PROTEÍNAS PELO SDS-PAGE..... | 47 |
| AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO PARÊNQUIMA TESTICULAR | 52 |
| Determinação das proporções volumétricas | 52 |
| Avaliação das anormalidades espermatogênicas..... | 52 |
| DISCUSSÃO | 55 |
| CONCLUSÃO..... | 62 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 63 |

LISTA DE TABELAS

- 1 **Peso dos órgãos acessórios dos animais dos grupos tratados e controle, nos quatro períodos de avaliação.** Os valores foram calculados como porcentagem do peso dos órgãos em relação à massa corporal. Os resultados estão apresentados como média \pm EPM, n=10 por grupo.....40
- 2 **Determinação da produção *in vitro* de Testosterona Total pelo parênquima testicular, na ausência e presença de diferentes concentrações (10, 100, 1.000 μ UI/ml) de hCG, dos animais dos grupos controle e tratados, em todos os períodos avaliados.** Os resultados estão apresentados como média (ng/g de tecido) \pm EPM, n=10 por grupo.....46
- 3 **Parâmetros de motilidade e vigor espermáticos, dos animais dos grupos controle e tratados, em todos os períodos avaliados.** Os valores estão apresentados como média \pm EPM, n=10 por grupo48
- 4 **Parâmetros de morfologia espermática dos animais dos grupos controle e tratados, em todos os períodos avaliados.** A avaliação morfológica foi calculada em porcentagem de anormalidades específicas (maiores e menores) e totais e os resultados estão apresentados como média \pm EPM, n=10 por grupo49
- 5 **Proporções volumétricas dos componentes testiculares dos animais dos grupos controle e tratados, em todos os períodos avaliados.** Os resultados estão apresentados como média \pm EPM, n=10 por grupo53

RESUMO

As avermectinas são utilizadas amplamente no tratamento de endo e ectoparasitoses. O efeito destas drogas sobre o aparelho reprodutor masculino tem sido pouco estudado. Nosso trabalho objetivou estudar se as avermectinas abamectina, doramectina e ivermectina teriam algum efeito sobre os órgãos, tecidos e hormônios envolvidos na reprodução. Ratos machos Wistar foram tratados com as diferentes avermectinas na dose de 1 mg/kg, subcutaneamente e no controle administrado o veículo. Os animais foram sacrificados na 1^a, 3^a, 5^a e 8^a semana pós inoculação do fármaco e parâmetros morfológicos e bioquímicos foram determinados. A massa do testículo, próstata, vesículas seminais, epidídimo e hipófise não foi diferente entre os grupos em todos os períodos estudados. Na análise da motilidade, vigor e morfologia espermática e na histologia do parênquima testicular não foi detectada qualquer aberração quando comparada ao controle em todas as semanas de estudo. O conteúdo epididimário ao ser submetido ao SDS-PAGE não revelou qualquer alteração no padrão eletroforético das proteínas entre os grupos estudados comparados ao controle. A determinação bioquímica sérica da glicemia e dos hormônios FSH, LH e Testosterona Total também mostrou não ser diferente entre os grupos estudados e controle. A responsividade do parênquima testicular incubado com hCG foi investigada através da produção da testosterona e esta não foi diferente entre todos os grupos estudados. Os dados sobre a evolução temporal da massa corpórea mostrou que os animais tiveram um ganho de massa corporal igual ao controle, exceto o grupo tratado com ivermectina, o qual teve um ganho significativo ($p < 0,05$) a partir da 3^a semana e esta diferença manteve-se até o final do período de estudo. Interessantemente, este ganho de massa corporal não foi provocado pelo aumento da ingestão alimentar. Nossos resultados sugerem que o tratamento com estas avermectinas não promovem qualquer alteração nos parâmetros reprodutivos estudados e a ivermectina foi capaz de induzir ganho de massa corporal sem alterar a ingestão alimentar.

ABSTRACT

Avermectins are widely used to treat endo and ectoparasitoses. The effect of such drug on male reproductive system is poorly studied. Our research aimed to study if the avermectins abamectin, doramectin and ivermectin would have any effect on organs, tissues and hormones involved in the reproduction. Male Wistar rats were treated with each different avermectins in the dose of 1 mg/kg, subcutaneously, and in the control was administered the vehicle. The animals were sacrificed in the 1^a, 3^a, 5^a and 8^a week post inoculation of the drug morphological and biochemical parameters were evaluated. The testes, prostate, seminal vesicles, epididymis and hipophysis mass were not different between the groups in whole period studied. Analysis of motility, vigor sperm morphology and the histology of testicular parenchyma did not detect any aberration as compared to control in the weeks studied. The epididymis content submitted to SDS-PAGE did not reveal any alteration on the eletrophoresis of proteins between the studied groups compared to control. The biochemical serum measurements of glycemia, LH, FSH hormones and total testosterone also not shown any difference between the experimental and control groups. The responsiveness of testicular parenchyma incubated with hCG were investigated by testosterone production and there was no difference in all groups studied. The data about the mass weight evolution showed gain in the body weight identical to the control group, except in the ivermectin group, which had a significant increase in the body weight ($p < 0,05$), starting at the 3rd week and this difference was kept throught the experiment. Interesting, this gain in body weight was not induced by increase in the food intake. Our results suggest that the treatment with these avermectins did not provoke any alteration in the reproductive parameteres studied and the ivermectin was able to induce increase in the body weight without changing the rate of food intake.

INTRODUÇÃO

A saúde e a produtividade dos animais de produção são constantemente desafiadas por uma ampla gama de parasitas nematóides e artrópodos. Quanto mais intensivo o tipo de produção, maior é o risco. As perdas devido a morbidez e mortalidade de rebanhos causadas por parasitas internos e externos foram estimadas em \$40 bilhões de dólares ao ano (LEANING e GUERRERO, 1987)

As avermectinas são produtos de tecnologia avançada e sua popularidade entre criadores e clínicos veterinários pode ser atribuída ao seu amplo espectro de ação, larga margem de segurança, facilidade de manuseio e melhoria da saúde e desempenho dos animais após sua utilização.

Desde o lançamento do primeiro produto à base de avermectina, o Ivermectin™ em 1981 (FORBES, 1993), foi desenvolvida uma ampla gama de formulações parenterais, orais e tópicas para controlar e tratar as principais afecções parasitárias internas e externas em diversas espécies de animais domésticos de produção e companhia. Na medicina humana, a ivermectina na forma de drágeas (Mectizam – Merck & Co., Inc.), é a principal fonte de tratamento utilizada para controle da elefantíase (*Wuchereria bancrofti*) (ABIOSE e JONES, 1993) e da oncocercose (*Onchocerca volvulus*), popularmente chamada de “cegueira dos rios”, a qual estima-se atingir cerca de 18 milhões de pessoas nas regiões tropicais do planeta e tem sua terapêutica centrada neste produto (GREENE *et al.*, 1995).

Anualmente são lançados no mercado novos produtos à base de avermectinas para o tratamento de parasitas em várias espécies de animais de produção, tendo a espécie bovina como principal alvo. Entretanto, apesar das expressivas cifras envolvendo a comercialização dos produtos à base de

avermectinas e do enorme número de animais e humanos submetidos à sua aplicação, a literatura mundial é muito escassa no que se refere à margem de segurança e possíveis efeitos deletérios de tais drogas sobre as características reprodutivas de machos. Desse modo, há grande lacuna a ser preenchida para que realmente se tenha segurança na utilização destas drogas, tanto em animais quanto na saúde do homem, principal escopo de qualquer pesquisa e trabalho científico.

AVERMECTINAS

DEFINIÇÃO

As Avermectinas constituem um grupo de antihelmínticos quimicamente relacionados, produzidos pela fermentação de um actinomiceto denominado *Streptomyces avermitilis* (Figura 1), o qual foi originalmente isolado de uma amostra de solo do território japonês (BURG *et al.*, 1979; PUTTER *et al.*, 1981; ONISHI e MILLER, 1985; HAYES e LAWS, 1990).

O cultivo destes microorganismos possibilitou isolar compostos ativos e em 1975, cientistas dos laboratórios Merck descobriram um complexo de oito componentes identificados como um grupo de derivados macrocíclicos da lactona com atividade acaricida, inseticida e nematocida sobre parasitas agrícolas, as avermectinas (*a* = sem + *verm* = verme + *ect* = ectoparasitas + *ina* = produto farmacêutico) (EGERTON *et al.*, 1979; BURG *et al.*, 1979; SHOOP, MROZIK e FISHER, 1995). A atividade endectocida das avermectinas sobre parasitas de animais, foi primeiramente descrita em 1979 (BURG *et al.*, 1979; EGERTON *et al.*, 1979; MILLER *et al.*, 1979).

As avermectinas são agentes que possuem numerosos efeitos farmacológicos, alta potência e boa margem de segurança em diferentes animais e, por isso, são extensamente utilizados na medicina veterinária para o tratamento e



FIGURA 1. *Streptomyces avermitilis* MA-4680^T. Fonte: <http://biolfunkc.kitasato.or.jp/>

controle de uma ampla variedade de infecções causadas por parasitas nematóides e artrópodos e, na medicina humana, é o fármaco de escolha no tratamento e controle da oncocercose causada pela *Onchocerca volvulus* e da elefantíase, causada pela *Wuchereria bancrofti* (CAMPBELL e BENZ, 1984; ELIS *et al.*, 1987; SANI e VAID, 1988; HAYES e LAWS, 1990; GOA, MCTAVISH e CLISSOLD, 1991; ABIOSE e JONES, 1993; GREENE *et al.*, 1995). Também em humanos, infecções gastrintestinais causadas por nematóides regridem a tratamentos à base de avermectinas (NAQUIRA *et al.*, 1989).

MECANISMO DE AÇÃO DAS AVERMECTINAS

A atividade antihelmíntica das avermectinas em mamíferos foi descrita pela primeira vez em 1979 por BURG *et al.*, EGERTON *et al.* e MILLER *et al.*. Desde então, estes compostos têm sido amplamente utilizados na medicina veterinária e humana para o tratamento e controle de uma ampla variedade de infecções causadas por parasitas nematóides e artrópodos. O mecanismo de ação das avermectinas sobre estes parasitas está relacionado à inibição da atividade motora do organismo. As avermectinas atuam modulando os canais de cloreto (Cl⁻) e promovendo um aumento da liberação de ácido gama-aminobutírico (GABA) nas sinapses das células nervosas (TURNER e SCHAEFFER, 1989; CULLY *et al.*, 1994; ARENA *et al.*, 1995).

O GABA é o principal neurotransmissor inibitório encontrado no sistema nervoso central (SNC) de mamíferos. É sintetizado e degradado através de uma série de reações enzimáticas conhecidas como “GABA-shunts” (DINGLELINE e MCBAIN, 1999). No tecido nervoso, o GABA e o glutamato, um neurotransmissor excitatório, parecem fazer parte de algumas vias metabólicas comuns em astrócitos. Ambos são captados pelos astrócitos e convertidos a glutamina, a qual é transportada de volta ao neurônio pré-sináptico. Em neurônios glutamatérgicos, a glutamina é convertida em glutamato que, a seguir, é rearmazenada nas vesículas sinápticas. Em neurônios GABAérgicos, após a conversão da glutamina em glutamato, este é transformado em GABA, que é então rearmazenado nas vesículas sinápticas (SMITH, 1997; DINGLELINE e MCBAIN, 1999).

Uma maior liberação de GABA promove hiperpolarização do potencial de repouso das células pós-sinápticas, dificultando a transmissão de impulsos nervosos. A hiperpolarização é provocada pela ligação do GABA ao seu receptor e esta interação do complexo neurotransmissor-receptor provoca aumento da condutância ao Cl^- , induzindo assim à hiperpolarização da membrana celular (DINGLELINE e MCBAIN, 1999; OLSEN e DELOY, 1999). Nos artrópodos este mecanismo ocorre na junção neuromuscular, provocando imobilização por produzir paralisia da musculatura. Os helmintos paralisados são expelidos através de varredura passiva pelo peristaltismo intestinal e eliminados nas fezes (SMITH, 1997). O modo de ação das avermectinas é distinto para animais invertebrados e vertebrados. Elas atuam em múltiplos sítios, e portanto existem vários sinalizadores diferentes em todos os sistemas até agora estudados (SUPAVILAI e KARABATH, 1981; TURNER e SCHAEFFER, 1989). O efeito das avermectinas é mediado por uma via específica e

a resposta fisiológica a estas ligações de alta afinidade ($\sim 10^{-10}\text{M}$) é um aumento na permeabilidade da membrana das células nervosas ao Cl^- , sendo este fluxo independente daquele mediado pelo receptor para o GABA, o receptor GABA_A , o qual está diretamente relacionado a um canal de Cl^- . Estes canais GABA-dependentes também parecem interagir com as avermectinas, mas apenas quando esta é administrada em altas doses ($\sim 10^{-7}\text{M}$) (PAUL, SKOLNICK e ZATZ, 1980; TURNER e SCHAEFFER, 1989).

MECANISMO DE AÇÃO DAS AVERMECTINAS EM ANIMAIS INVERTEBRADOS

Estudos eletrofisiológicos demonstraram que em animais invertebrados, as avermectinas atuam potencializando a ação dos canais de Cl^- associados ao receptor GABA_A sensíveis às avermectinas (CULLY *et al.*, 1994; ARENA *et al.*, 1995). Desta maneira, as avermectinas provocam aumento na permeabilidade das membranas celulares ao íon Cl^- , devido à sua interação com os sítios de ligação ao receptor GABA_A ou por regular a liberação endógena do aminoácido GABA (MELLIN *et al.*, 1983; ALBERT *et al.*, 1986; ARENA *et al.*, 1992). KASS *et al.* (1980, 1984), demonstraram que as avermectinas agem inibindo a transmissão de impulsos entre interneurônios e motoneurônios excitatórios situados no cordão nervoso ventral, bem como a transmissão entre motoneurônios inibitórios e músculos. Estes autores observaram, também, que estes compostos possuem pequeno efeito sobre a transmissão neuromuscular excitatória.

DUCE e SCOTT (1983, 1985) e TANAKA e MATSUMURA (1985), observaram a existência de feixes musculares específicas, sensíveis ao GABA em músculo extensor tibial de gafanhotos (*Schistocerca gregaria*), enquanto uma população separada de feixes musculares, que recebe apenas inervação excitatória, são GABA-insensíveis. Os feixes musculares sensíveis ao GABA recebem inervação inibitória e exibem tanto resposta reversível como irreversível às avermectinas. Baixas concentrações de avermectinas ($\sim 10^{-10}$ M) promovem aumento dose-dependente reversível na permeabilidade das membranas ao íon Cl^- , devido a uma interação com o complexo receptor de GABA-canal de Cl^- -avermectinas. Por outro lado, concentrações mais altas destes compostos ($\sim 10^{-8}$ M) produzem um aumento irreversível na condutância aos íons Cl^- , pois a concentração destes íons continua a subir depois da remoção das avermectinas. Em neurônios GABA-insensíveis, que não possuem inervação inibitória, as avermectinas induzem somente aumento irreversível na condutância ao Cl^- (TURNER e SCHAEFFER, 1989; ARENA *et al.*, 1991).

MECANISMO DE AÇÃO DAS AVERMECTINAS EM ANIMAIS VERTEBRADOS

Em animais vertebrados, as avermectinas têm demonstrado possuir atividade antihelmíntica tremendamente eficiente, devido às suas habilidades em matar parasitas sem afetar o organismo hospedeiro.

Diferentemente dos animais invertebrados, onde o GABA é um neurotransmissor neuromuscular, em mamíferos o GABA é encontrado exclusivamente no SNC (COOPER, 1982). Esta diferença na localização dos receptores para o GABA parece ser a razão da ampla margem de segurança dos produtos contendo avermectinas em mamíferos, pois como estes compostos apresentam pesos moleculares elevados, não atravessam facilmente a barreira hematoencefálica para atuarem no SNC (LANKAS e GORDON, 1989). Além disso, em mamíferos, a interação das avermectinas com os receptores para GABA é de uma afinidade 100 vezes menor do que a encontrada em invertebrados (SCHAEFFER e HAINES, 1989; RHORER e ARENA, 1995)

As avermectinas agem estimulando a liberação endógena de GABA (PONG, WANG e FRITZ, 1980; PONG, DeHAVEN e WANG, 1981). Esta resposta é relativamente específica, porque não ocorre liberação endógena concomitante de glutamato. ISHIKO *et al.* (1985), demonstraram efeito inibitório cálcio-dependente-potássio-estimulado da liberação de dopamina em tecidos perfundidos com avermectinas (10^{-3}M a 10^{-2}M) mas, as concentrações superfarmacológicas de avermectinas necessárias para desencadear este tipo de resposta sugerem que este fato não é relevante no entendimento do modo de ação destes compostos em animais vertebrados.

PONG e WANG (1982), utilizando preparados de cérebro de cão, identificaram ligações específicas das avermectinas com uma aparente constante de dissociação. Estas ligações de alta afinidade são saturáveis e a densidade dos sítios de ligação é estimado em 1,54 pmol/mg de proteína.

Está bem estabelecido que o GABA estimula o influxo de Cl^- em tecidos neuronais (SCHARTZ, SUDAK e PAUL, 1986). Em mamíferos, as avermectinas ligam-se com alta afinidade a sítios associados, mas não idênticos, nos receptores GABAérgicos e, segundo SODERLAUD, ADAMS e BLOOMQUIST (1987), em estudos realizados com ratos, na presença de GABA estes componentes atuam como inibidores da captação de Cl^- e como fracos ativadores, quando na ausência de GABA. Entretanto, quando estes estudos foram realizados utilizando-se tecido cerebral de camundongos, observou-se que as avermectinas atuaram apenas como antagonista não-competitivo à captação GABA-estimulada. Por outro lado, SCHAEFER e BERGSTROM (1988) demonstraram que o GABA aumenta a captação de Cl^- no córtex cerebral de ratos e que as avermectinas potencializam o influxo de Cl^- através do receptor GABA_A estimulado, sem elevar a resposta a máxima ao aminoácido GABA. As razões para a diferença entre estes resultados e os resultados encontrados anteriormente são desconhecidas. Porém, os resultados do citado trabalho sugerem que as avermectinas estimulam a captação de Cl^- , pois estas aumentaram fortemente, de maneira dose-dependente, o fluxo de Cl^- através de receptores GABAérgicos.

FARMACOCINÉTICA

As propriedades farmacocinéticas das avermectinas estão em função da espécie e do componente em estudo.

São bem absorvidas quando administradas por via oral ou parenteral e rapidamente metabolizadas no fígado (95%), ocorrendo a excreção em maiores percentagens nas fezes (98%), urina e leite (AYRES e ALMEIDA, 1996).

A ivermectina possui meia vida plasmática de 11 horas em humanos (FINK e PORRAS, 1989; WHITWORTH, 1992), 72 horas em bovinos (AHRENS, 1997), 64 horas em ovinos (FINK e PORRAS, 1989), 38 horas em cães (KOJIMA, YAMAMOTO e NAKANISHI, 1987), 48 horas em suínos (FINK e PORRAS, 1989) e 15 horas em eqüinos (ASQUITH *et al.*, 1987). Em bovinos, a meia vida plasmática da abamectina é de 72 horas (FINK e PORRAS, 1989) e da doramectina é de 89 horas (AYRES e ALMEIDA, 1996). A meia vida plasmática da abamectina e da doramectina ainda não foi determinada nas outras espécies de animais domésticos.

Pouca quantidade destes medicamentos é detectada nos músculos e rins e concentrações elevadas são observadas nos pulmões e pele por longos períodos após administração (AYRES e ALMEIDA, 1996). As concentrações nos fluídos orgânicos são mantidas por longo tempo, sendo o período de carência para consumo da carne do animal tratado, relativamente longo (abamectina: 21 dias; doramectina: 35 dias; ivermectina: 28 dias).

SEGURANÇA

As avermectinas possuem boa margem de segurança na dosagem clínica recomendada, sendo que a dose terapêutica pode ser multiplicada por 20 em ruminantes e por 10 em eqüinos, suínos e cães (exceto os da raça "Collie" e das raças "Sheepdog") (FASSLER *et al.*, 1991), sem desenvolver quaisquer sinais de toxicidade (PULLIAM e PRESTON, 1989). Possível morte é observada apenas quando a dose é multiplicada por 40 em ruminantes, 60 em eqüinos, 100 em suínos e 200 em cães (exceto os da raça Collie e das raças Sheepdog, que são suscetíveis a doses de 0,1 mg/kg m.c.) (LEVIS, MERCHANT e NEER, 1994).

TOXICIDADE

O mecanismo de toxicidade das avermectinas em mamíferos ainda é desconhecido. Cães da raça “Collie” (FASSLER *et al.*, 1991) e das raças “Sheepdog” (“Shetland”, “Old English” e “Australian Sheepdog”) e gatos podem apresentar sinais de intoxicação e distúrbios neurológicos, resultando, muitas vezes, em morte quando expostos a baixas concentrações de ivermectina. O mecanismo exato da toxicidade nestes animais é desconhecido, mas parece estar relacionado com uma maior permeabilidade da barreira hematoencefálica (LEVIS, MERCHANT e NEER, 1994; AYRES e ALMEIDA, 1996).

Diferentemente dos animais invertebrados, onde o GABA é um neurotransmissor neuromuscular, em mamíferos o GABA é encontrado exclusivamente no SNC (COOPER, 1982). Considerando que as avermectinas atuam estimulando a liberação de GABA, os efeitos sobre este neurotransmissor são relevantes para a segurança nestes animais.

INTOXICAÇÃO AGUDA E SUBCRÔNICA

Intoxicação experimental aguda em roedores e primatas tem mostrado claras diferenças na sensibilidade entre as espécies. Os roedores são os únicos que apresentam intoxicação à nível de SNC em resposta às avermectinas. Esta afirmação baseia-se em observações de sinais clínicos, como tremores e ataxia,

produzidos pelo uso de altas doses de avermectinas em roedores, sendo que outras espécies, incluindo humanos, não apresentaram nenhum efeito adverso frente às mesmas doses (LANKAS e GORDON, 1989). Roedores neonatos mostram-se suscetíveis aos efeitos tóxicos provocados pelas avermectinas, devido ao desenvolvimento da barreira hematoencefálica ser pós-natal nestas espécies (BETZ e GOLDSTEIN, 1981). Diferentemente, nos outros mamíferos, inclusive o homem, esta estrutura é totalmente formada no período pré-natal (BOHR e MOLLGARD, 1974).

De modo geral, a ivermectina mostra menor efeito tóxico comparada à abamectina, quando utilizadas em animais de laboratório, embora os sinais clínicos de intoxicação sejam idênticos, dependendo da espécie. Observa-se midríase, diminuição transitória da visão, emese e sedação em cães e macacos. Convulsões, tremores, ataxia, bradicardia, letargia e depressão do SNC, podendo levar ao coma em muitas espécies, quando da administração em altas doses (EGERTON *et al.*, 1979; CAMPBELL e BENZ, 1984; LANKAS e GORDON, 1989; TURNER e SCHAEFFER, 1989). Em humanos, os sinais limitam-se a leve prurido, erupções cutâneas, febre, cefaléia, dores musculares e articulares, entumescimento dos gânglios linfáticos e, raramente, tontura e hipotensão postural (WHITWORTH, 1992; FISHER e MROZIK, 1992). LANKAS e GORDON (1989) relataram que uma superdose aguda em uma criança, exposta a aproximadamente 8 mg/Kg de ivermectina (via oral), produziu sinais clínicos semelhantes aos observados em macacos, sendo estes efeitos rapidamente revertidos. Os autores sugeriram que macacos são o modelo mais apropriado para prognosticar possíveis efeitos tóxicos agudos das avermectinas em humanos.

A suscetibilidade em primatas não-humanos (macaco Rhesus) e humanos foi estudada administrando-se doses entre 0,2 e 24 mg/Kg (macacos) e 0,2 e 8,6 mg/Kg (humanos). Observou-se que os macacos toleram doses que produzem efeitos tóxicos severos em outras espécies de animais e, deste modo, determinou-se que a dose tóxica mínima (MDT) para esta espécie é 2 mg/Kg. Esta dose é 10 vezes maior que a utilizada terapeuticamente no tratamento da oncocercose humana (GREENE *et al.*, 1995).

TOXICIDADE NO DESENVOLVIMENTO

Estudos sobre os efeitos das avermectinas sobre o desenvolvimento corporal fetal foram realizados administrando estes compostos diariamente, durante o período de organogênese (terço médio da gestação) em camundongas, ratas e coelhas gestantes, utilizando doses de 0,1; 0,2; 0,4 e 0,8 mg/Kg/dia; 2,5; 5 e 10 mg/Kg/dia; 1; 5; 3 e 6 mg/kg/dia, respectivamente. Os resultados demonstraram uma baixa incidência de anormalidades fetais, observadas apenas nos grupos tratados com as maiores doses de avermectinas. Nestes grupos, foram observados sinais severos de maternotoxicidade, caracterizados por sedação, tremores, convulsões e morte de algumas gestantes e uma baixa incidência de fenda palatina nos fetos. Em camundongos, observou-se aumento na incidência de fenda palatina nos fetos nascidos de mães pertencentes aos grupos que receberam doses de 0,4 e 0,8 mg/kg/dia. O tratamento produziu tremores, convulsões, coma e mortalidade de algumas gestantes nos três grupos de camundongas tratadas com as dosagens mais

elevadas. Em ratos, este tratamento também resultou em maternotoxicidade, caracterizada por sedação leve, observou-se baixa incidência de fenda palatina nos fetos do grupo tratado com 10 mg/Kg/dia. Em coelhos, as fêmeas do grupo tratado com 6 mg/Kg/dia mostraram sinais de sedação intensa, 24 horas após a sétima dose, que persistiram por mais 8 dias após cessado o tratamento. Apresentaram também, diminuição significativa da massa corporal que está, provavelmente, relacionada ao elevado e constante estado de sedação e conseqüente menor ingestão alimentar. Nas outras duas espécies estudadas, não houve alteração da massa corporal durante as 2 semanas de observação, sugerindo que estes compostos não afetam o ganho de peso dos animais (LANKAS e GORDON, 1989).

CARCINOGENICIDADE E TERATOGENICIDADE

Estudos realizados com ivermectina e abamectina demonstraram que estes compostos não aumentam a incidência de tumores quando administrados nas doses máximas toleráveis (8mg/Kg/dia) em camundongos e ratos submetidos a tratamentos prolongados, 22 e 24 meses, respectivamente (MANTEL *et al.*, 1982; TUKEY, CIMINERA e HEYSE, 1985).

A atividade genotóxica destes compostos foi testada através de estudos *in vitro* com células de camundongos (CLIVE *et al.*, 1972; CLIVE e SPECTOR, 1975), de humanos (WILKINS e HART, 1973; WILLIAMS, LASPIA e DUNKEL, 1982) e de microrganismos (AMES, McCANN e YAMASAKI, 1975), não resultando em nenhum efeito mutagênico. LANKAS e GORDON (1989), estudando os efeitos das

avermectinas sobre a formação fetal em ratos, camundongos e coelhos, não encontraram nenhuma incidência de anormalidades fetais.

Estudos realizados por SALAMA *et al.* (1995) com camundongos, revelaram que a abamectina, em doses de 1 a 3 mg/kg, combinadas com colchicina (0,6 mg/kg), induziram a anormalidades mitóticas fisiológicas e clastogênicas, explicadas pelo duplo efeito provocado pela quebra de seqüências cromossômicas (GROVER e MALHI, 1988), possivelmente produzidas pela interação direta entre a abamectina e o DNA cromossômico (SALAMA *et al.*, 1995).

TOXICIDADE REPRODUTIVA

SALAMA *et al.* (1995), encontraram alta percentagem (65,4 e 21,6%) de anormalidades na morfologia de espermatozóides colhidos de epidídimos de camundongos submetidos a tratamento com abamectina, nas dosagens de 1 e 3 mg/Kg, respectivamente, associadas a uma dose de colchicina (0,6 mg/kg), na primeira semana após o início do tratamento. Interessantemente, nenhuma alteração foi encontrada a nível de espermátides, espermatócitos e células em estágio inicial de meiose analisadas neste mesmo período, bem como nos períodos seguintes (terceira, quinta e oitava semanas). Os autores sugeriram que o efeito específico da abamectina sobre espermatozóides armazenados no epidídimo, após a primeira semana de tratamento seja, possivelmente, devido a diferenças na capacidade de reparação de sistemas enzimáticos presentes nos diferentes estágios da espermatogênese da espécie animal estudada. Esta hipótese ainda não foi testada.

ESTRUTURA QUÍMICA DAS AVERMECTINAS

As avermectinas são produzidas a partir de uma mistura de oito diferentes componentes obtidos pela fermentação do *Streptomyces avermitilis*, formados de 16 estruturas macrocíclicas fundidas a uma unidade hexahidrobenzenofurano nas posições 2 a 8 e uma unidade espiroqueta nas posições 17 a 25. Com base em suas estruturas químicas (Figura 2), os quatro componentes obtidos em maiores quantidades pelo processo de fermentação são identificados pela subscrição “a” (avermectinas A_{1a}, A_{2a}, B_{1a}, B_{2a}) e os outros quatro componentes, obtidos somente em mínimas quantidades, são identificados pela subscrição “b” (avermectinas A_{1b}, A_{2b}, B_{1b}, B_{2b}). Cada um dos oito componentes possui atividade antihelmíntica (SHOOP, MROZIK e FISHER, 1995).

Os componentes “A” possuem um grupo metoxila na posição 5, enquanto os componentes “B” possuem um grupo hidroxila nesta mesma posição. Os componentes “1” possuem dupla ligação entre as posições 22 e 23, enquanto os componentes “2” possuem ligação simples e um grupo hidroxila na posição 23. Os componentes “a” possuem uma cadeia secundária butila na posição 25, enquanto os componentes “b” possuem um substituinte isopropila nesta posição (SHOOP, MROZIK e FISHER, 1995).

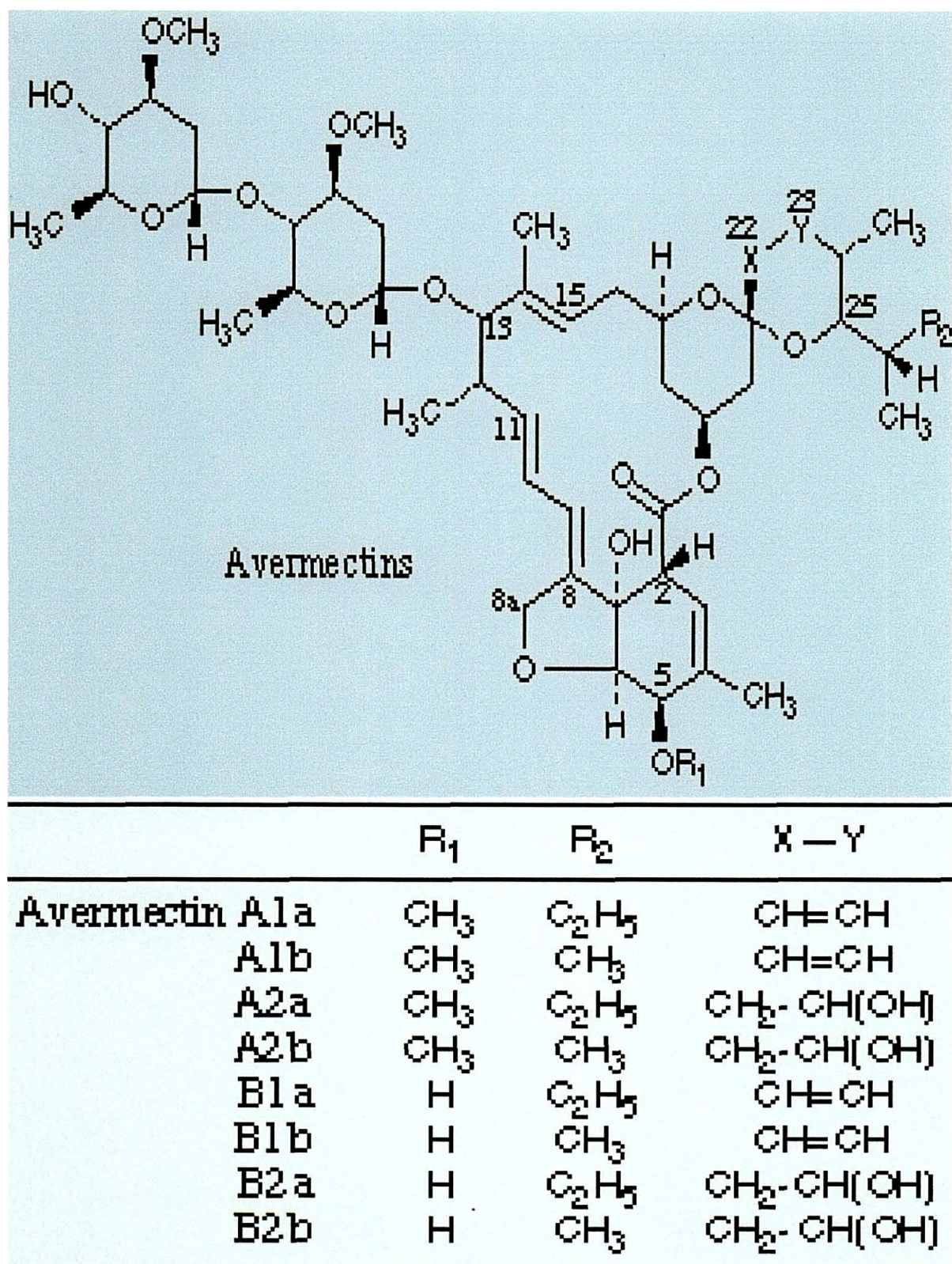


FIGURA 2. Estrutura química das avermectinas. Fonte: <http://biolfunkc.kitasato.or.jp/>

ANTÍDOTOS

Ferramentas farmacológicas podem e têm sido utilizadas na tentativa de minimizar os efeitos indesejáveis provocados por intoxicação pelas avermectinas (ISHIKO *et al.*, 1985).

A bicuculina, o butilbiciclofosforotionato (TBPS) e a picrotoxina, são alcalóides vegetais com atividade antagonista ao GABA_A, (SIEGHART, 1985) são utilizadas com este propósito (ROBERTSON, 1989).

ISHIKO *et al.* (1985), estudando tecidos perfundidos com avermectinas (10^{-3}M a 10^{-2}M), demonstraram que os efeitos das avermectinas foram completamente antagonizados pela picrotoxina (10^{-5}M) e bicuculina (10^{-4}M).

AVERMECTINAS UTILIZADAS NESTE ESTUDO

ABAMECTINA

A abamectina é um produto de ocorrência natural, produzido pela fermentação do *Streptomyces avermitilis*, composto pela associação de 80% de avermectina B_{1a} e 20% de avermectina B_{1b}. Foi primeiramente utilizada para controle de insetos e parasitas agrícolas (EGERTON, *et al.*, 1979; DYBAS e GREEN, 1984) e a partir de 1979 reconhecido como potente agente quimioterápico contra nematóides e artrópodos parasitas de animais (BURG *et al.*, 1979; EGERTON *et al.*, 1979; MILLER *et al.*, 1979). Ela é a única avermectina utilizada tanto para proteção da saúde animal como agrícola (SHOOP, MROZIK e FISHER, 1995) e seu peso molecular é 873,11 kDa (EGERTON, *et al.*, 1980; PUTTER *et al.*, 1981; CAMPBELL *et al.*, 1983; DYBAS e GREEN, 1984; LANKAS e GORDON, 1989; LASOTA e DYBAS, 1991).

DORAMECTINA

A doramectina é uma variedade produzida por biossíntese mutacional, através da fermentação de uma nova cepa do *Streptomyces avermitilis*, descoberta pela Pfizer, Inc.. Sua formulação química é 25-ciclohexil-5-0-dimetil-25-de (1-metilpropil) avermectina A_{1a} (C₅₀H₇₄O₁₄), geralmente descrita como 25-cicloexil-

avermectina B_{1b} (GOUDIE *et al.*, 1993; JONES *et al.*, 1993; LOGAN *et al.*, 1993). Foi primeiramente comercializada em 1993 e possui peso molecular de 899,14 kDa (CAPRONI, 1999).

IVERMECTINA

A ivermectina é um análogo semi-sintético quimicamente modificado da abamectina, sintetizado através da hidrogenação da dupla ligação entre as posições cis 22 e 23 da avermectina B₁ (LANKAS e GORDON, 1989). Consiste em um par de homólogos estreitamente relacionados, que diferem somente por uma unidade metileno (CH₂) na posição 26. É formada pela composição de 80% de 22,23-diidroavermectina B_{1a} e 20% de 22,23-diidroavermectina B_{1b}, nominada como 22,23-diidro-avermectina B₁. É produzida comercialmente para uso em animais desde 1981 (SHOOP, MROZIK e FISHER, 1995), sendo a única avermectina utilizada no tratamento de humanos (WHITWORTH, 1992; GREENE *et al.*, 1995). Seu peso molecular é 873,11 kDa (CHABALA *et al.*, 1980; EGERTON, *et al.*, 1980; LANKAS e GORDON, 1989; FORBES, 1993; SHOOP, MROZIK e FISHER, 1995).

ESTRUTURA QUÍMICA DAS AVERMECTINAS UTILIZADAS NESTE ESTUDO

A estrutura química das avermectinas utilizadas neste estudo diferem umas das outras apenas no tipo de ligação entre as posições 22 e 23 e no grupo ligado à posição 25.

A abamectina e a doramectina possuem uma dupla ligação entre as posições 22 e 23, enquanto a ivermectina possui uma ligação simples e hidrogênios adicionais nestas posições. A abamectina e a ivermectina possuem uma cadeia isopropila na posição 25, enquanto a doramectina possui uma cadeia cicloexila nesta mesma posição (LANKAS e GORDON, 1989; GOUDIE *et al.*, 1993).

JUSTIFICATIVAS

As justificativas para a execução do presente trabalho, estão baseadas nos seguintes fatos:

1. na literatura mundial, trabalhos com avermectinas relacionados a reprodução de machos são escassos e, ainda necessitam de comprovação;
2. em relação à doramectina, não há nenhum relato na literatura de seus possíveis efeitos sobre o sistema reprodutivo de machos;
3. há expressivo número de doses de diferentes produtos à base de avermectinas sendo continuamente comercializadas e aplicadas em diversas espécies de animais domésticos, havendo poucos estudos sobre os possíveis efeitos deletérios destas sobre a capacidade reprodutiva de machos;
4. o tratamento com drogas à base de avermectinas na espécie humana tem sido pouco estudado e, se há algum efeito deletério sobre a sua saúde reprodutiva, ainda não é sabido;
5. os valores econômicos envolvidos tanto na produção e comercialização de tais drogas são de extremo vulto para serem desconsiderados.

OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho é investigar os possíveis efeitos das avermectinas (abamectina, doramectina e ivermectina), na dosagem de 1,0 mg/kg m.c. (massa corporal), sobre parâmetros reprodutivos de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), bem como verificar qual fase da gametogênese tornar-se-á suscetível aos possíveis efeitos de tais drogas.

MATERIAL E MÉTODOS

ANIMAIS

Foram utilizados 160 ratos albinos machos, da linhagem Wistar (*Mus norvegicus albinus*), com 90 dias de idade, obtidos do biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os animais foram mantidos em ambiente climatizado (22°C) e com controle de luminosidade (12h escuro:12h iluminado), recebendo alimentação balanceada (Nuvilab CR1-Nuvital®) e água *ad libitum*.

REAGENTES, ENZIMAS E HORMÔNIOS

Bicarbonato de sódio, citrato de sódio, cloreto de sódio, hidróxido de sódio, sulfato de cobre, metanol e tartarato de sódio e potássio, foram obtidos da Reagem Quimibrás Indústrias Químicas S/A, Brasil.

Ácido bórico, acrilamida, azul de bromofenol, ditioneitol (DTT), dodecil sulfato de sódio (SDS), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), glicerol, glicina, glutamina, metileno bis-acrilamida, mercaptoetanol, persulfato de amônio, tetrametil-

etilenodiamino (temed), Tris-HCl, Tris-base, triton X-100, tween 20 e kit de coloração por prata, foram adquiridos da Pharmacia Biotech AB, Suécia.

Deoxicolato de sódio, Folin-Ciocalteu, Igepal, piruvato de sódio, albumina sérica bovina (BSA), gonadotrofina coriônica humana (hCG) e marcadores de proteína de alto e baixo peso molecular (Sigma Marker™), foram obtidos da Sigma®-EUA.

Formalina foi adquirida da CAQ- Casa da Química Indústria e Comércio Ltda, Brasil.

Meio de cultura Eagle e marcador de proteína de amplo espectro (BenchMark™), foram obtidos da Gibco BRL (Life Technologies™), EUA.

Kits Coat-A-Count® de radioimunoensaio para determinação da testosterona total, Hormônio Folículo Estimulante (FSH) e Hormônio Luteinizante (LH), foram adquiridos da DPC®-Diagnostic Products Corporation, EUA.

Kit Glicose enzimática GOD-ANA foi obtido da Labtest Diagnóstica S/A, Brasil.

Leupeptina e aprotinina foram adquiridas da ICN Pharmaceutical Inc., EUA.

Abamectina (AVOTAN*) foi gentilmente cedida pelos Laboratórios Hoechst Roussel Vet., Brasil.

Doramectina (DECTOMAX®) foi gentilmente cedida pelos Laboratórios Pfizer Ltda, Divisão Agropecuária, Brasil.

Ivermectina (SUPRAMEC®) foi gentilmente cedida pelos Laboratórios Schering-Plough, Brasil.

PLANO EXPERIMENTAL

PROTOCOLO DE TRATAMENTO

Os animais foram divididos, aleatoriamente, em quatro grupos: controle (GC), tratados com abamectina (GA), tratados com doramectina (GD) e tratados com ivermectina (GI). Em seguida, receberam injeção subcutânea (s.c.) única das drogas em estudo na dose de 1 mg/kg de massa corporal (m.c.), diluídas em óleo de girassol, conforme protocolo de tratamento abaixo, sendo no GC injetado apenas o veículo:

| GRUPO | DROGA | DOSE (mg/kg m.c.) |
|-------|-------------|--------------------------------------|
| G C | CONTROLE | 0,5 ml óleo de girassol |
| G A | ABAMECTINA | 1,0 + óleo de girassol q.s.p. 0,5 ml |
| G D | DORAMECTINA | 1,0 + óleo de girassol q.s.p. 0,5 ml |
| G I | IVERMECTINA | 1,0 + óleo de girassol q.s.p. 0,5 ml |

PROTOCOLO DE ESTUDO

Os grupos foram separados, para o protocolo de estudo, em 1^a, 3^a, 5^a e 8^a semana pós inoculação da droga, utilizando-se 10 animais por grupo em cada semana de estudo.

AValiação DOS GRUPOS

PESAGEM DOS ANIMAIS

Os animais foram pesados a cada dois dias em balança eletrônica, modelo XL-410 (Denver Instruments Company, EUA), para avaliação da evolução da massa corporal. Também foi determinada a quantidade de ração consumida para avaliação da ingestão alimentar, no mesmo equipamento.

COLHEITA DOS ESPERMATOZÓIDES

Os animais foram anestesiados com tiopental sódico (50 mg/Kg m.c.), administrado via intra-peritoneal (i.p.). A colheita dos espermatozóides foi realizada conforme descrito por KEMPINAS e LAMANO-CARVALHO (1988), incisando-se

longitudinalmente a cauda do epidídimo esquerdo com uma lâmina de bisturi nº15. O conteúdo espermático epididimário colhido foi colocado em 500 µl de meio de cultura Eagle e mantido na temperatura de 38°C.

COLHEITA DO SANGUE

Os animais foram sacrificados por decapitação e o sangue colhido em tubos de ensaio de 10 ml, com o auxílio de um funil. O sangue foi então centrifugado em centrífuga refrigerada (5°C, 2500 RPM) modelo PR-2 (International Equipment Company, EUA) para obtenção do soro, o qual foi estocado a -20°C, para posterior análise bioquímica.

COLHEITA E PESAGEM DO TESTÍCULO, ÓRGÃOS ACESSÓRIOS E HIPÓFISE

Logo após o sacrifício, testículo e epidídimo direito, vesículas seminais, próstata e hipófise foram retirados, dissecados e pesados em balança analítica eletrônica, modelo AA-200 (Denver Instruments Company, EUA).

PRODUÇÃO DE TESTOSTERONA *IN VITRO*

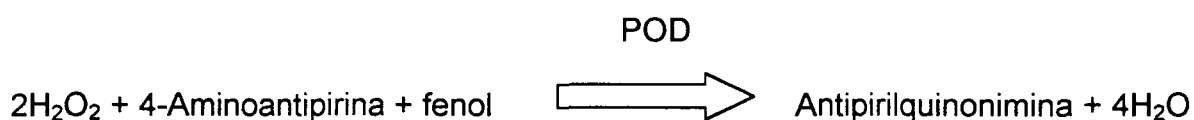
A produção de testosterona *in vitro* foi realizada segundo método descrito por KEMPINAS *et al* (1998a), modificado. O testículo esquerdo de cada animal foi desencapsulado e seu parênquima fragmentado em peças de aproximadamente 100 mg. Cada fragmento foi colocado em um frasco contendo 0,9 ml de meio de cultura Eagle enriquecido com 1 M de piruvato de sódio, 1 ml de antibiótico, 26,2 mM de bicarbonato de sódio, 2 M de glutamina e 0,1% de albumina sérica bovina, pH 7,4. A incubação do parênquima testicular foi realizada em duplicata, na ausência e presença de hCG em diferentes concentrações (10, 100 e 1.000 μ UI/ml), por uma hora a 37°C. A incubação foi interrompida colocando-se os frascos em gelo. O material foi acondicionado em eppendorfs de 1,5 ml, centrifugado em minicentrífuga modelo 14000 (VWR Scientific Products, IL-EUA) por 5 min a 13000 RPM e o sobrenadante estocado a -20°C, para posterior análise bioquímica.

DETERMINAÇÃO DA GLICEMIA

A determinação da glicose sérica foi efetuada utilizando-se o método enzimático colorimétrico, segundo descrição de TRINDER (1969), pelo kit Glicose enzimática, cujo princípio consiste na catálise da oxidação da glicose pela enzima glicose oxidase (GOD-B-D-Glicose: oxigênio-1-oxiredutase), de acordo com a seguinte reação:



Em seguida, o peróxido de hidrogênio formado reage com a 4-aminoantipirina e o fenol, sob ação catalisadora da peroxidase (POD-Doador: hidrogênio-peróxido oxiredutase), através de uma reação oxidativa de acoplamento, formando uma antipirilquinonimina vermelha cuja intensidade de cor é proporcional à concentração da glicose da amostra, conforme reação:



A determinação da absorbância das amostras foi realizada utilizando-se espectrofotômetro Ultrospec® 2000 (Pharmacia Biotech Inc., CA-EUA) a 505 nm.

DOSAGEM HORMONAL

A concentração hormonal sérica de testosterona, LH e FSH, foi determinada utilizando-se kit Coat-A-Count® de radioimunoensaio. O mesmo procedimento foi usado para determinar a produção de testosterona pelo parênquima testicular incubado. Após o radioimunoensaio, a leitura das amostras foi efetuada em contador gama modelo 10/600 (ICN Biomedical, Inc., EUA).

MOTILIDADE E VIGOR ESPERMÁTICO

Imediatamente após a colheita dos espermatozóides da cauda do epidídimo esquerdo, uma amostra foi analisada (gota diluída 1:2 entre lâmina e lamínula), sob microscopia ótica (Westover™, 100x), utilizando ocular simples (Leica®, 10x) quanto à motilidade individual (porcentagem de espermatozóides com motilidade progressiva) e vigor (1-5), conforme metodologia descrita por CHAPIN e HEINDEL (1993).

MORFOLOGIA ESPERMÁTICA

As suspensões espermáticas usadas para avaliação da motilidade e vigor espermático, foram diluídas 1:9 em solução formalina 4% + citrato de sódio 3%. Uma amostra foi colocada entre lâmina e lamínula para análise sob microscopia de contraste de fase (200x), com o objetivo de analisar a morfologia espermática. Duzentos espermatozóides por amostra foram avaliados individualmente e a amostra foi classificada em porcentagem de anormalidades específicas (maiores e menores) e totais, segundo BLOM (1973).

DOSAGEM DE PROTEÍNAS TOTAIS DO CONTEÚDO EPIDIDIMÁRIO

A determinação do conteúdo de proteínas totais foi realizada pelo método de LOWRY *et al.* (1951), utilizando-se albumina bovina como padrão. O princípio consiste na hidrólise alcalina das proteínas espermáticas obtidas do conteúdo epididimário, com posterior reação de hidroxilas fenólicas com o reagente colorimétrico de Folin-Ciocalteu, que pode ser acompanhada espectrofotometricamente a 750 nm.

O conteúdo epididimário foi colocado em 1 ml de tampão de lise-RIPA, cuja composição final é dodecil sulfato de sódio 0,1%, Igepal 1%, deoxicolato de sódio 1%, Tris-HCl 10 Mm, cloreto de sódio 150 mM, Leupeptina 10 µg/l e Aprotinina 10 µg/l, pH 7,5. Após permanecer neste tampão por 20 minutos, em gelo, a amostra foi centrifugada em minicentrífuga refrigerada (4°C, 13000 RPM) modelo 1201 (VWR Scientific Products, IL-EUA). Retirou-se uma alíquota do sobrenadante que foi diluída (1:10) em água destilada e seu conteúdo proteico total determinado utilizando-se espectrofotômetro Ultrospec® 2000 (Pharmacia Biotech Inc., CA-EUA) a 750 nm.

ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA- DODECIL SULFATO DE SÓDIO (SDS-PAGE)

O método de SDS-PAGE consiste na separação de proteínas através de seus pesos moleculares sem modificação das unidades proteicas, permitindo visualização e estudo posterior dessas frações.

Utilizou-se o método de LAEMMLI modificado por GARFIN (1990), o qual envolve um sistema descontínuo de dois géis contíguos, porém diferentes: o gel de resolução ("staging" gel) e o de separação ("resolving" gel). Do sobrenadante obtido após a centrifugação das amostras do conteúdo epididimário mantidas em tampão de lise, retirou-se 500 µl ao qual foi adicionado 500 µl de tampão Laemmli, cuja composição final é SDS 9%, glicerol 15%, Tris-HCl 0,05M, azul de bromofenol 0,05% e mercaptoetanol 6%. As amostras foram ebulidas a 100°C por 5 minutos e então submetidas ao SDS-PAGE (10%), colocando-se 100 µg de proteína por "lane".

Após a corrida das amostras no sistema SE 600 (Hoefer® - Amersham Pharmacia Biotech, CA-EUA), com o uso da fonte EPS 300 (Pharmacia Biotech Inc., CA-EUA), o gel foi colocado em solução reveladora de proteínas por coloração por prata (kit de coloração por prata).

HISTOLOGIA DO PARÊNQUIMA TESTICULAR

O testículo direito de cada animal, foi processado para histologia conforme técnica descrita por MICHALANY (1980) e os cortes histológicos foram corados com eosina alcoólica e hematoxilina de Haris.

A avaliação histológica da espermatogênese foi realizada através de microscopia ótica comum, onde procurou-se:

1. Mensurar as proporções volumétricas dos componentes do parênquima testicular, seguindo método descrito por ELIAS *et al.* (1971) e BOLENDER (1982), utilizando ocular integradora KPL (integrationsplate II 100/25 [8x] Zeiss West Germany) acoplada em microscópio Nikon Optiphot-2 (40 x);
2. Verificar anormalidades espermatogênicas e determinar o tipo celular degenerado, conforme descrito por ALLEN (1919), utilizando ocular simples (10x, Zeiss West Germany) acoplada em microscópio Nikon Optiphot-2 (40 x).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

As diferenças entre as médias dos grupos controle e experimental foram determinadas usando-se o teste "t" de Student para um nível de significância de $p < 0,05$.

RESULTADOS

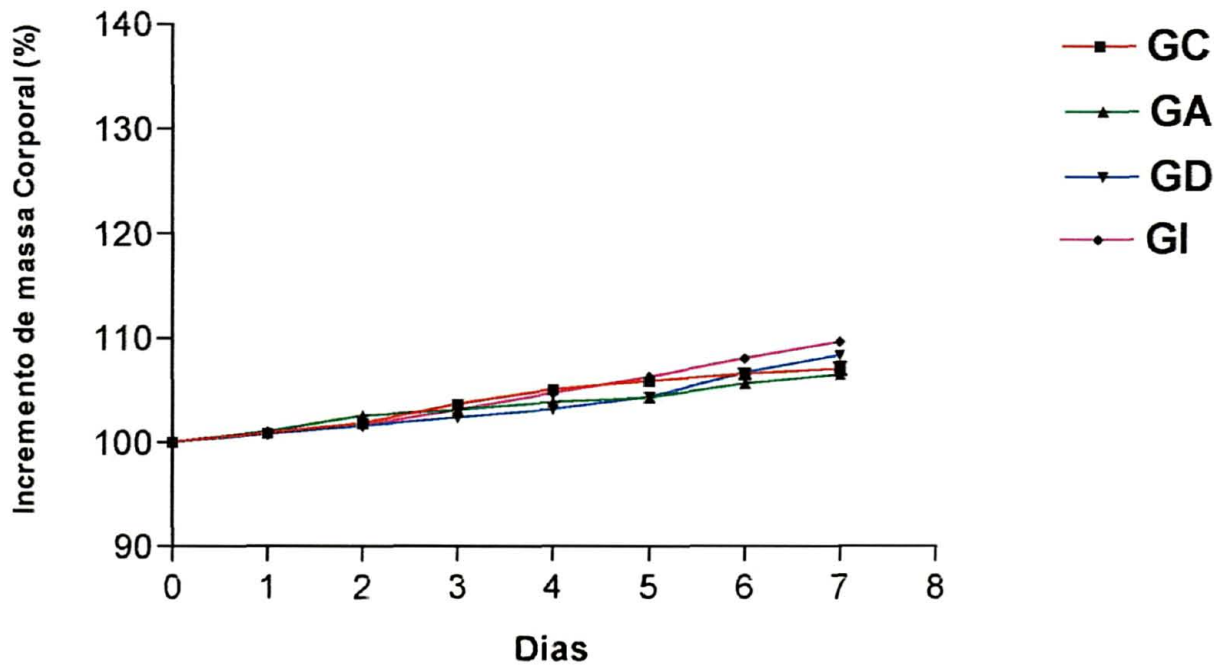
DETERMINAÇÃO DA EVOLUÇÃO DA MASSA CORPORAL

As porcentagens de incremento de massa corporal em relação ao valor inicial (100%) de todos os grupos estudados estão representadas nas Figuras 3 e 4. Em todos os grupos avaliados houve incremento de massa corporal ao longo de todo o período experimental. Os animais avaliados na primeira e terceira semana (Figura 3) não apresentaram diferença significativa da massa corporal quando comparados ao controle ou entre si. Nos animais avaliados na quinta e oitava semana (Figura 4) houve significativo incremento de massa corporal no grupo tratado com ivermectina (GI), quando comparado ao grupo controle e aos demais grupos tratados.

DETERMINAÇÃO DA PESAGEM DOS TESTÍCULOS, ÓRGÃOS ACESSÓRIOS E HIPÓFISE

A Tabela 1 mostra os valores obtidos na pesagem do testículo direito, epidídimo direito, vesículas seminais, próstata e hipófise, calculados em percentagem do valor da massa corporal do animal. Não houve diferença significativa no peso dos órgãos acessórios e da hipófise entre os grupos estudados.

PRIMEIRA SEMANA



TERCEIRA SEMANA

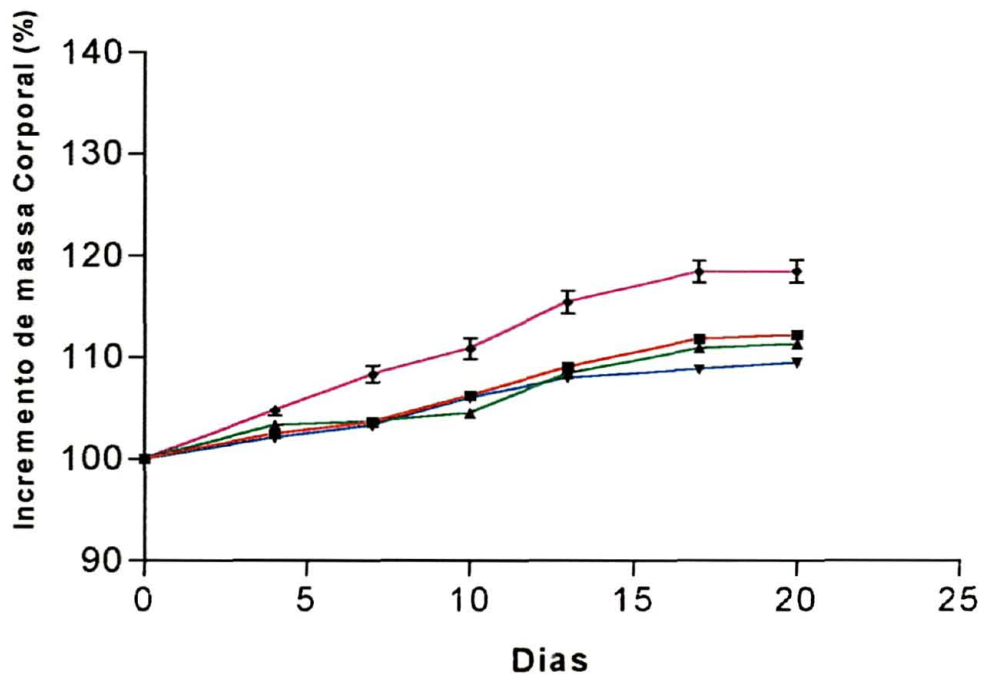


FIGURA 3. Determinação da massa corporal dos grupos controle e tratados avaliados na primeira e terceira semana após início do tratamento. O peso inicial foi considerado 100% e as variações calculadas periodicamente. Os resultados estão apresentados como média \pm EPM, n=10 por grupo (teste "t").

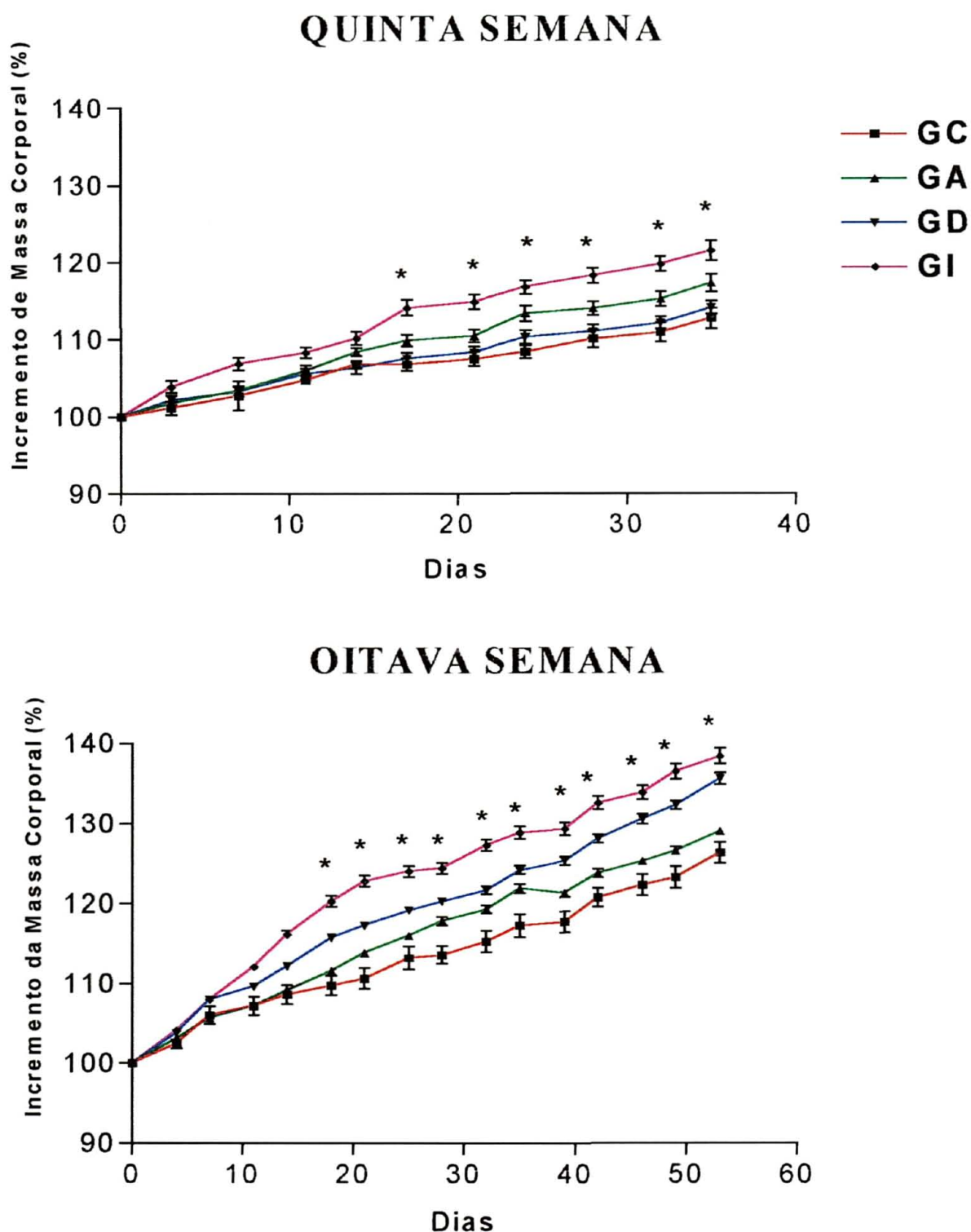


FIGURA 4. Determinação da massa corporal dos grupos controle e tratados avaliados na quinta e oitava semana após início do tratamento. O peso inicial foi considerado 100% e as variações calculadas periodicamente. Os resultados estão apresentados como média \pm EPM, $n=10$ por grupo, $*p<0,005$ (teste "t").

TABELA 1. Peso dos órgãos acessórios dos animais dos grupos tratados e controle, nos quatro períodos de avaliação. Os valores foram calculados como porcentagem do peso dos órgãos em relação à massa corporal. Os resultados estão apresentados como média \pm EPM, n=10 por grupo.

| PRIMEIRA SEMANA | | | | |
|------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | GC | GA | GD | GI |
| testículo | 0,426 \pm 0,005 | 0,438 \pm 0,007 | 0,429 \pm 0,002 | 0,442 \pm 0,005 |
| epidídimo | 0,153 \pm 0,002 | 0,154 \pm 0,001 | 0,153 \pm 0,002 | 0,151 \pm 0,002 |
| ves. seminais | 0,392 \pm 0,028 | 0,405 \pm 0,040 | 0,379 \pm 0,034 | 0,372 \pm 0,018 |
| próstata | 0,100 \pm 0,009 | 0,109 \pm 0,013 | 0,100 \pm 0,014 | 0,098 \pm 0,008 |
| hipófise | 0,0026 \pm 0,0003 | 0,0025 \pm 0,0003 | 0,0021 \pm 0,0003 | 0,0023 \pm 0,0003 |
| TERCEIRA SEMANA | | | | |
| testículo | 0,524 \pm 0,025 | 0,535 \pm 0,027 | 0,572 \pm 0,025 | 0,568 \pm 0,011 |
| epidídimo | 0,206 \pm 0,016 | 0,189 \pm 0,009 | 0,172 \pm 0,016 | 0,182 \pm 0,006 |
| ves. seminais | 0,383 \pm 0,006 | 0,372 \pm 0,004 | 0,372 \pm 0,004 | 0,387 \pm 0,012 |
| próstata | 0,109 \pm 0,004 | 0,105 \pm 0,005 | 0,106 \pm 0,003 | 0,113 \pm 0,005 |
| hipófise | 0,0032 \pm 0,0001 | 0,0033 \pm 0,002 | 0,0029 \pm 0,0002 | 0,0030 \pm 0,0002 |
| QUINTA SEMANA | | | | |
| testículo | 0,503 \pm 0,010 | 0,486 \pm 0,020 | 0,479 \pm 0,017 | 0,438 \pm 0,035 |
| epidídimo | 0,190 \pm 0,006 | 0,177 \pm 0,006 | 0,178 \pm 0,007 | 0,176 \pm 0,009 |
| ves. seminais | 0,404 \pm 0,023 | 0,407 \pm 0,017 | 0,401 \pm 0,016 | 0,390 \pm 0,045 |
| próstata | 0,122 \pm 0,012 | 0,117 \pm 0,009 | 0,118 \pm 0,009 | 0,114 \pm 0,014 |
| hipófise | 0,0028 \pm 0,0001 | 0,0027 \pm 0,0001 | 0,0028 \pm 0,0002 | 0,0027 \pm 0,0001 |
| OITAVA SEMANA | | | | |
| testículo | 0,501 \pm 0,006 | 0,483 \pm 0,012 | 0,495 \pm 0,005 | 0,502 \pm 0,007 |
| epidídimo | 0,193 \pm 0,010 | 0,188 \pm 0,004 | 0,185 \pm 0,002 | 0,184 \pm 0,003 |
| ves. seminais | 0,453 \pm 0,011 | 0,443 \pm 0,009 | 0,463 \pm 0,014 | 0,448 \pm 0,017 |
| próstata | 0,155 \pm 0,012 | 0,143 \pm 0,002 | 0,146 \pm 0,004 | 0,151 \pm 0,005 |
| hipófise | 0,0030 \pm 0,0003 | 0,0027 \pm 0,0002 | 0,0029 \pm 0,0003 | 0,0028 \pm 0,0001 |

DETERMINAÇÃO DA GLICEMIA

Não houve alteração significativa da glicemia dos grupos tratados quando comparados ao controle, em todos os períodos estudados (Figura 5).

DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO HORMONAL CIRCULANTE

TESTOSTERONA, LH E FSH

As concentrações séricas de Testosterona Total (Figura 6), do Hormônio Luteinizante (LH) (Figura 7) e do Hormônio Folículo Estimulante (FSH) (Figura 8) não foram significativamente diferentes nos animais dos grupos tratados quando comparados à do controle, em todos os períodos estudados.

PRODUÇÃO DE TESTOSTERONA *IN VITRO*

Não houve diferença significativa na produção de Testosterona Total pelo parênquima testicular incubado, na ausência e presença de hCG, nos animais dos grupos tratados quando comparados aos do controle, em todos os períodos estudados (Tabela 2).

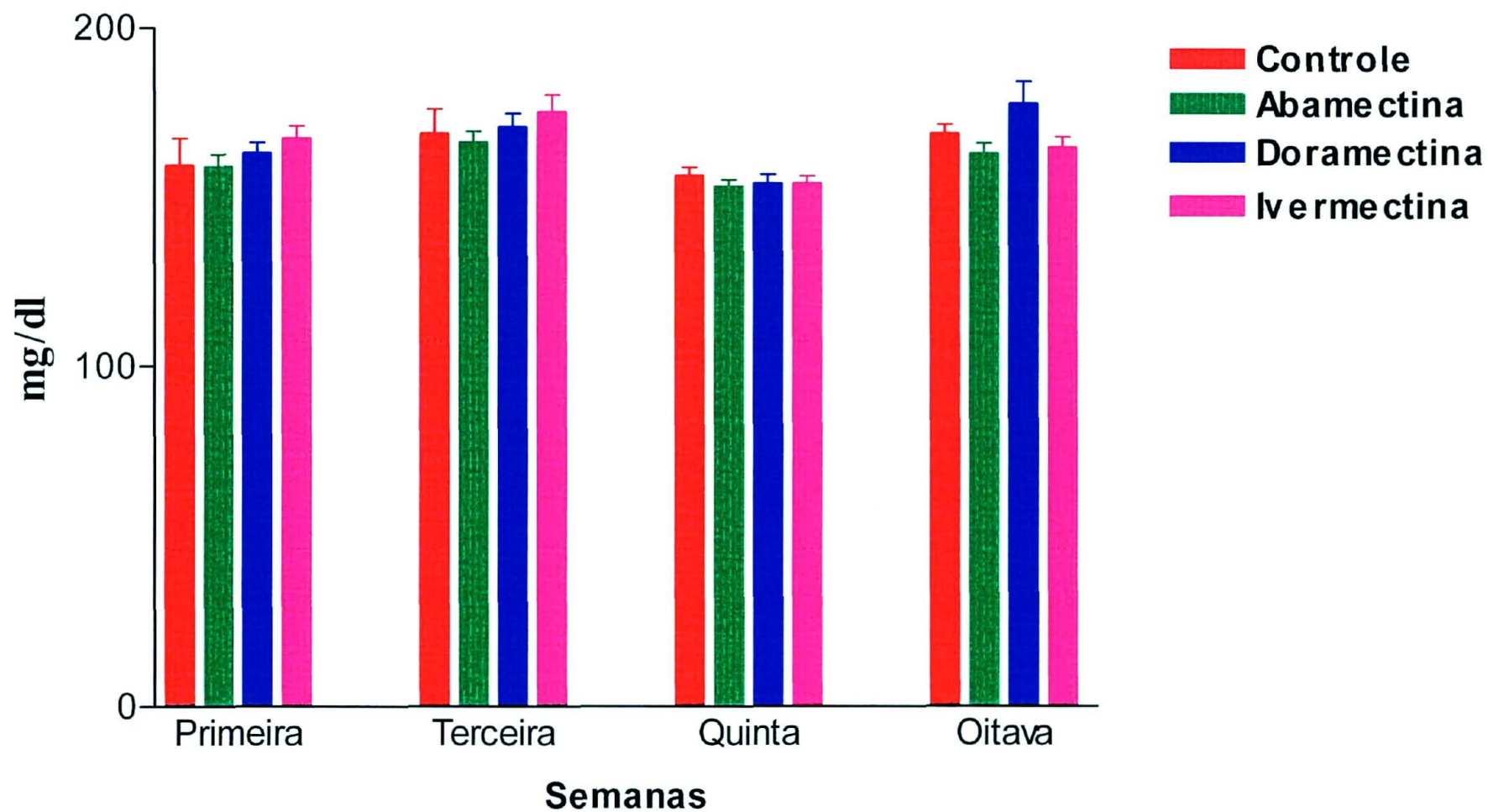


FIGURA 5. **Determinação da glicemia dos animais dos grupos controle e tratados, em todos os períodos avaliados.** Os resultados estão apresentados como média \pm EPM, n=10 por grupo.

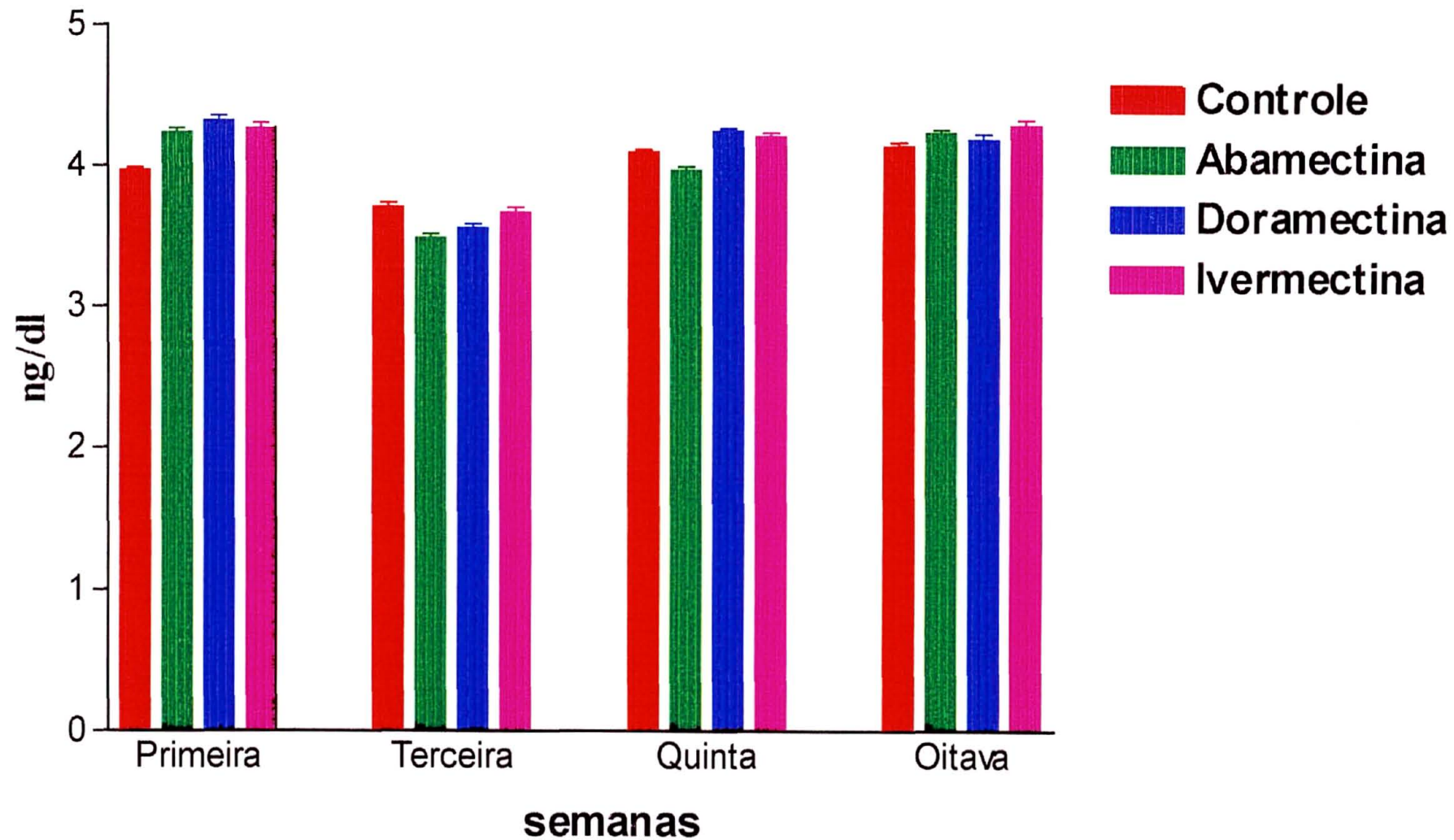


FIGURA 6. Determinação da Testosterona Total sérica dos animais dos grupos controle e tratados, em todos os períodos avaliados. Os resultados estão apresentados como média \pm EPM, n=10 por grupo.

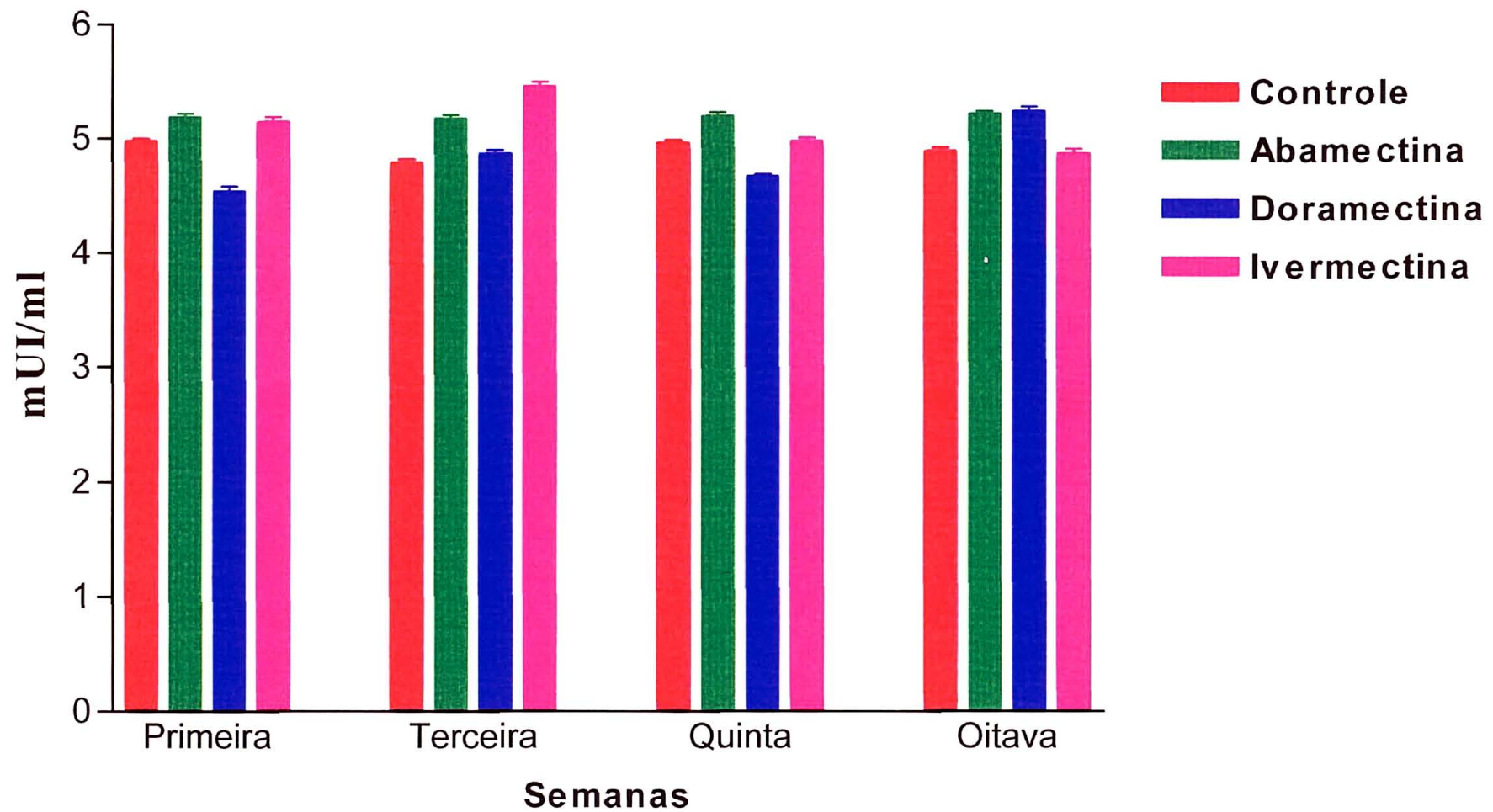


FIGURA 7. Determinação de LH sérico dos animais dos grupos controle e tratados, em todos os períodos avaliados. Os resultados estão apresentados como média \pm EPM, n=10 por grupo.

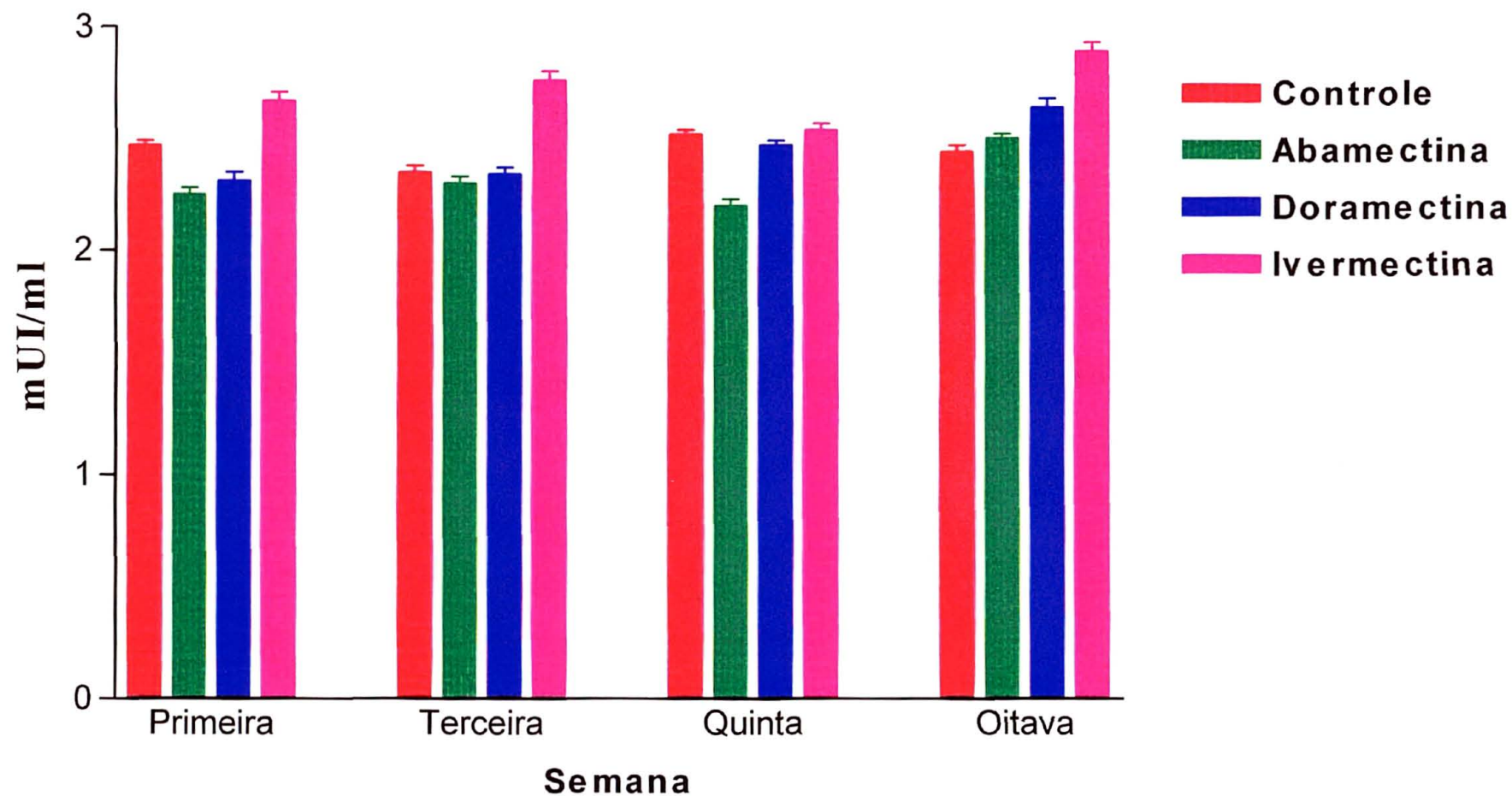


FIGURA 8. **Determinação de FSH sérico dos animais dos grupos controle e tratados, em todos os períodos avaliados.** Os resultados estão apresentados como média \pm EPM, n=10 por grupo.

TABELA 2. Determinação da produção *in vitro* de Testosterona Total pelo parênquima testicular, na ausência e presença em diferentes concentrações (10, 100, 1.000 μ UI/ml) de hCG, dos animais dos grupos controle e tratados, em todos os períodos avaliados. Os resultados estão apresentados como média (ng/g de tecido) \pm EPM, n=10 por grupo.

| PRIMEIRA SEMANA | | | | |
|-----------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| hCG | GC | GA | GD | GI |
| 0 | 431,90 \pm 434,40 | 532,60 \pm 100,70 | 433,15 \pm 12,50 | 499,86 \pm 66,72 |
| 10 | 1199,65 \pm 182,05 | 1164,00 \pm 145,30 | 1245,30 \pm 292,80 | 1265,55 \pm 279,25 |
| 100 | 1928,95 \pm 73,65 | 2018,30 \pm 157,00 | 2028,40 \pm 171,10 | 2100,05 \pm 97,45 |
| 1000 | 3765,85 \pm 755,15 | 4739,85 \pm 218,85 | 4490,60 \pm 30,44 | 4618,37 \pm 114,57 |
| TERCEIRA SEMANA | | | | |
| 0 | 497,54 \pm 322,12 | 478,94 \pm 112,40 | 512,54 \pm 87,42 | 499,45 \pm 94,25 |
| 10 | 1242,80 \pm 198,80 | 1212,04 \pm 172,25 | 1202,42 \pm 154,20 | 1180,86 \pm 212,24 |
| 100 | 2002,40 \pm 134,00 | 2024,60 \pm 168,40 | 2004,85 \pm 72,45 | 2008,45 \pm 83,48 |
| 1000 | 3984,95 \pm 698,42 | 4234,86 \pm 342,95 | 4529,47 \pm 78,45 | 4598,42 \pm 98,25 |
| QUINTA SEMANA | | | | |
| 0 | 512,48 \pm 128,24 | 486,24 \pm 98,43 | 542,54 \pm 102,32 | 506,34 \pm 104,25 |
| 10 | 1302,40 \pm 72,30 | 1327,20 \pm 102,34 | 1242,27 \pm 264,35 | 1168,42 \pm 158,29 |
| 100 | 2198,00 \pm 102,40 | 2116,64 \pm 98,03 | 1937,95 \pm 146,34 | 2086,29 \pm 145,27 |
| 1000 | 4120,67 \pm 476,02 | 3998,42 \pm 315,24 | 4602,00 \pm 122,31 | 4423,52 \pm 69,84 |
| OITAVA SEMANA | | | | |
| 0 | 524,37 \pm 298,90 | 513,25 \pm 112,23 | 502,45 \pm 89,24 | 519,36 \pm 100,02 |
| 10 | 1193,47 \pm 135,62 | 1249,36 \pm 135,51 | 1198,49 \pm 276,24 | 1206,40 \pm 243,21 |
| 100 | 2090,34 \pm 99,09 | 1998,35 \pm 79,24 | 2028,30 \pm 168,24 | 2125,02 \pm 100,24 |
| 1000 | 4086,54 \pm 598,52 | 4424,32 \pm 47,28 | 4624,85 \pm 204,36 | 4721,12 \pm 216,37 |

DETERMINAÇÃO DA MOTILIDADE E VIGOR ESPERMÁTICO

Ávaliando-se os parâmetros correspondentes a motilidade individual progressiva e vigor espermáticos, não encontrou-se diferenças significativas nos grupos tratados quando comparados ao grupo controle, em todos os períodos estudados (Tabela 3).

DETERMINAÇÃO DA MORFOLOGIA ESPERMÁTICA

Não houve diferença significativa na morfologia espermática nas amostras avaliadas dos grupos tratados em relação ao grupo controle, em todos os períodos estudados (Tabela 4). Na figura 9 tem-se a visualização dos espermatozóides em microscopia de contraste de fase, dos animais do GI, na quinta semana de avaliação.

DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE PROTEÍNAS PELO SDS-PAGE

A análise quantitativa de proteínas através do SDS-PAGE revelou não existir alteração na quantidade destas no conteúdo epididimário dos grupos tratados em comparação ao controle (Figura 10).

TABELA 3. Parâmetros de motilidade individual progressiva e vigor espermático, dos animais dos grupos controle e tratados, em todos os períodos avaliados. Os valores estão apresentados como média \pm EPM, n=10 por grupo.

| PRIMEIRA SEMANA | | | | |
|-------------------|------------------|-----------------|-----------------|------------------|
| | GC | GA | GD | GI |
| Motilidade | 61,0 \pm 3,1 | 64,4 \pm 2,4 | 63,3 \pm 1,7 | 65,0 \pm 2,2 |
| Vigor | 2,4 \pm 0,4 | 2,5 \pm 0,2 | 2,4 \pm 0,2 | 2,3 \pm 0,2 |
| TERCEIRA SEMANA | | | | |
| Motilidade | 62,87 \pm 3,2 | 63,67 \pm 4,3 | 62,75 \pm 1,4 | 64,77 \pm 4,22 |
| Vigor | 2,3 \pm 1,5 | 2,1 \pm 1,2 | 2,7 \pm 1,1 | 2,8 \pm 1,2 |
| QUINTA SEMANA | | | | |
| Motilidade | 61,42 \pm 2,8 | 63,34 \pm 2,4 | 61,23 \pm 3,4 | 64,40 \pm 2,4 |
| Vigor | 2,4 \pm 2,1 | 2,7 \pm 0,8 | 2,4 \pm 1,6 | 2,2 \pm 0,8 |
| OITAVA SEMANA | | | | |
| Motilidade | 59,67 \pm 2,14 | 59,87 \pm 3,8 | 58,67 \pm 2,6 | 61,77 \pm 3,9 |
| Vigor | 2,6 \pm 1,2 | 2,7 \pm 1,4 | 2,6 \pm 1,4 | 2,7 \pm 0,9 |

TABELA 4. Parâmetros de morfologia espermática dos animais dos grupos controle e tratados, em todos os períodos avaliados. A avaliação morfológica foi calculada em porcentagem de anormalidades específicas (maiores e menores) e totais e os resultados estão apresentados como média \pm EPM, n=10 por grupo.

| PRIMEIRA SEMANA | | | | |
|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | GC | GA | GD | GI |
| Defeitos Maiores | 4,60 \pm 0,58 | 5,40 \pm 0,98 | 3,90 \pm 0,97 | 5,10 \pm 0,45 |
| Defeitos Menores | 6,30 \pm 1,40 | 7,40 \pm 2,04 | 4,50 \pm 2,20 | 5,40 \pm 1,90 |
| Defeitos Totais | 10,97 \pm 2,2 | 11,80 \pm 3,4 | 8,02 \pm 2,4 | 9,56 \pm 1,8 |
| TERCEIRA SEMANA | | | | |
| Defeitos Maiores | 1,88 \pm 0,50 | 2,10 \pm 0,56 | 2,40 \pm 0,54 | 1,96 \pm 0,56 |
| Defeitos Menores | 3,40 \pm 1,54 | 4,60 \pm 1,24 | 3,90 \pm 2,3 | 4,50 \pm 2,1 |
| Defeitos Totais | 5,28 \pm 1,9 | 5,70 \pm 2,5 | 6,92 \pm 1,6 | 6,76 \pm 2,4 |
| QUINTA SEMANA | | | | |
| Defeitos Maiores | 0,90 \pm 0,24 | 1,24 \pm 0,62 | 1,48 \pm 0,98 | 1,76 \pm 0,58 |
| Defeitos Menores | 5,82 \pm 3,03 | 6,74 \pm 2,20 | 6,98 \pm 1,98 | 5,60 \pm 2,12 |
| Defeitos Totais | 6,02 \pm 3,1 | 8,28 \pm 1,8 | 8,86 \pm 2,6 | 7,92 \pm 1,8 |
| OITAVA SEMANA | | | | |
| Defeitos Maiores | 0,68 \pm 0,66 | 1,24 \pm 0,62 | 1,32 \pm 0,66 | 0,98 \pm 0,64 |
| Defeitos Menores | 5,86 \pm 2,98 | 6,34 \pm 2,14 | 7,22 \pm 3,04 | 6,12 \pm 3,46 |
| Defeitos Totais | 7,24 \pm 1,66 | 8,58 \pm 1,24 | 8,56 \pm 2,6 | 8,80 \pm 1,8 |

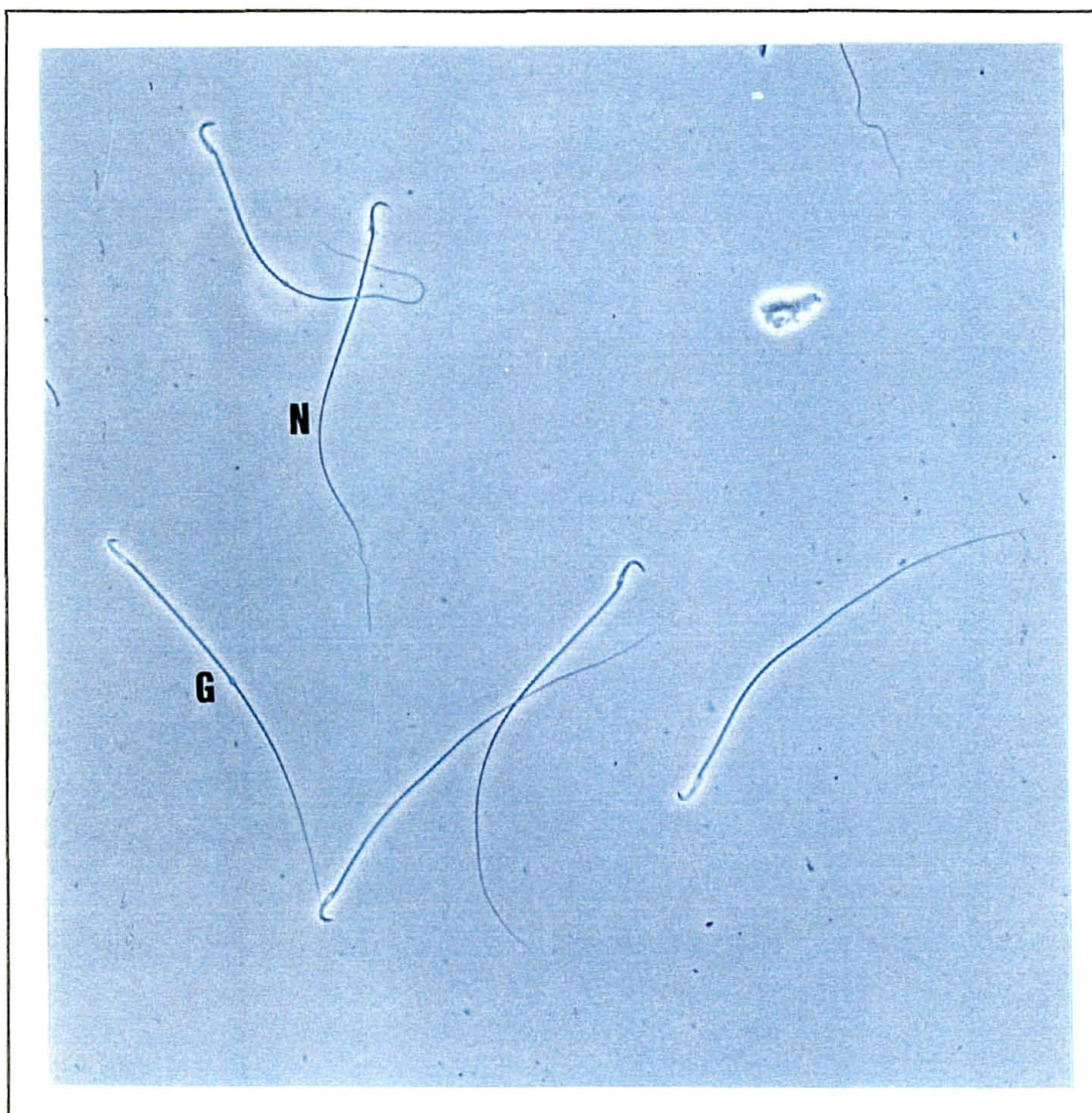


FIGURA 9. Visualização de espermatozoides, em microscopia de contraste de fase (40x), dos animais do GI avaliados na quinta semana após início do tratamento. A letra N indica um espermatozoide morfologicamente íntegro e a letra G indica um espermatozoide com gota citoplasmática distal.

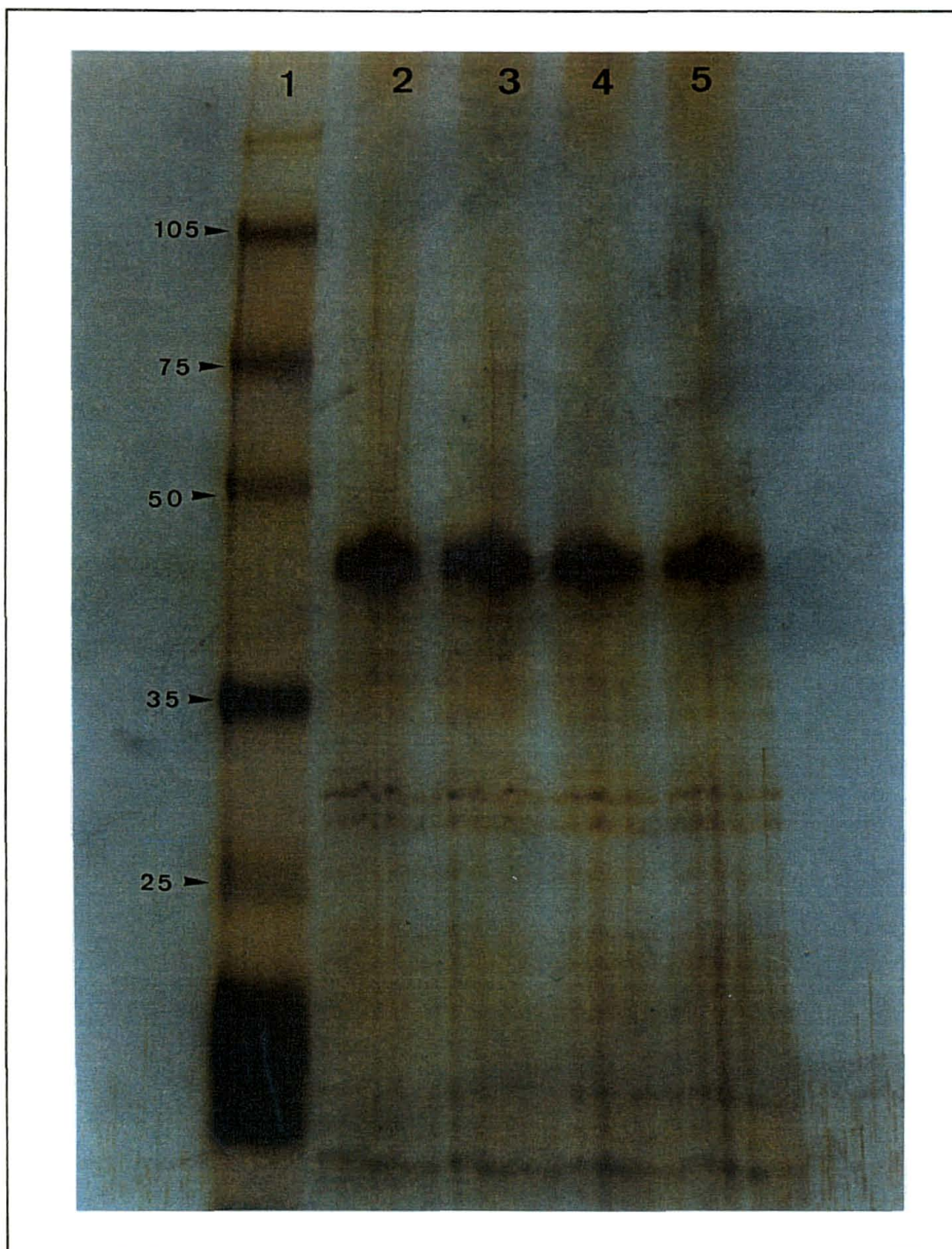


FIGURA 10. Perfil eletroforético das proteínas do conteúdo epididimário dos grupos controle e tratados avaliados na quinta semana após início do tratamento, coradas com prata. Quantidades iguais de proteínas (60 $\mu\text{g}/\text{lane}$) foram submetidas a SDS-PAGE. "Lanes": 1, marcador molecular RPN 800 (Amersham International plc); 2, GC; 3, GA; 4, GD e 5, GI. As setas à esquerda indicam os pesos moleculares em kDa.

AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO PARÊNQUIMA TESTICULAR

DETERMINAÇÃO DAS PROPORÇÕES VOLUMÉTRICAS

As avaliações das proporções volumétricas dos túbulos seminíferos (túnica própria, epitélio seminífero e lúmen tubular) e do tecido intersticial (células de Leydig e estroma), não foram diferentes significativamente entre os grupos tratados e controle, em todos os períodos estudados (Tabela 5).

AVALIAÇÃO DAS ANORMALIDADES ESPERMATOGÊNICAS

A análise das secções histológicas do parênquima testicular não revelou nenhuma anormalidade ou degeneração celular entre os grupos tratados e controle. Foram observados: espermatócitos primários nos estágios de zigóteno e paquíteno, espermátides alongadas e arredondadas e células de Sertoli. Na Figura 11 está representado a análise da quinta semana, a qual não foi diferente da primeira, terceira e oitava semanas (dados não mostrados).

TABELA 5. Proporções volumétricas dos componentes testiculares dos animais dos grupos controle e tratados, em todos os períodos avaliados. Os resultados estão apresentados como média \pm EPM, n=10 por grupo.

| PRIMEIRA SEMANA | | | | |
|------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | GC | GA | GD | GI |
| % vol TS | 83,95 \pm 0,56 | 85,9 \pm 0,88 | 83,45 \pm 0,57 | 82,2 \pm 0,65 |
| % vol TI | 16,05 \pm 0,56 | 14,10 \pm 0,88 | 16,55 \pm 0,57 | 17,80 \pm 0,65 |
| TERCEIRA SEMANA | | | | |
| % vol TS | 86,03 \pm 0,18 | 84,95 \pm 0,36 | 86,18 \pm 0,18 | 84,78 \pm 0,67 |
| % vol TI | 13,97 \pm 0,18 | 15,05 \pm 0,36 | 13,82 \pm 0,18 | 15,22 \pm 0,67 |
| QUINTA SEMANA | | | | |
| % vol TS | 84,71 \pm 0,45 | 82,58 \pm 0,45 | 81,99 \pm 0,56 | 80,86 \pm 0,48 |
| % vol TI | 15,29 \pm 0,45 | 17,42 \pm 0,45 | 18,01 \pm 0,56 | 19,14 \pm 0,48 |
| OITAVA SEMANA | | | | |
| % vol TS | 82,91 \pm 0,56 | 80,20 \pm 0,65 | 83,27 \pm 0,36 | 80,46 \pm 0,67 |
| % vol TI | 17,09 \pm 0,56 | 19,80 \pm 0,65 | 16,73 \pm 0,36 | 19,54 \pm 0,67 |

TS = Túbulos Seminíferos

TI = Tecido Intersticial

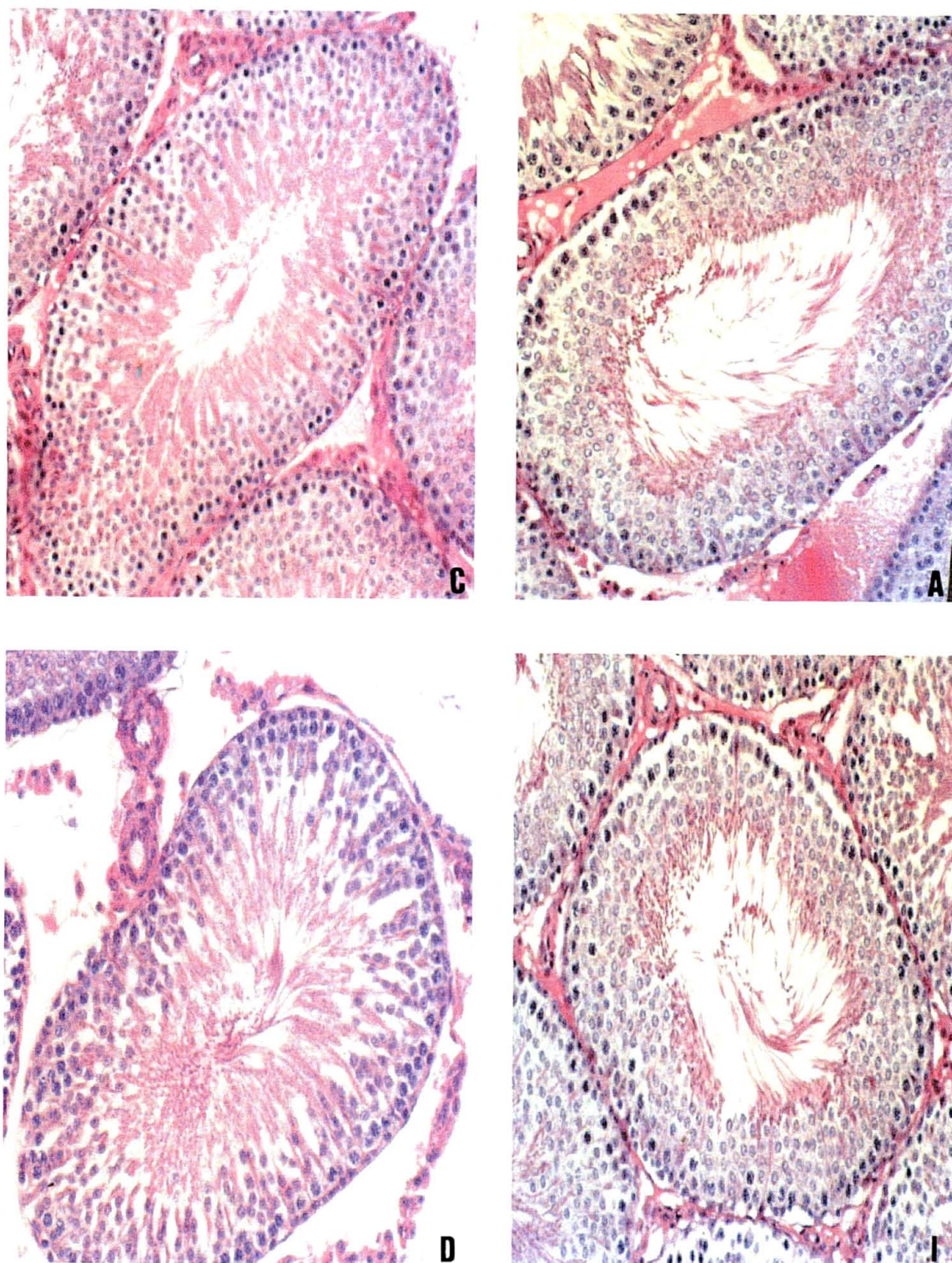


FIGURA11. Corte histológico do parênquima testicular corado com H.E., dos grupos controle e tratados avaliados na quinta semana após início do tratamento. (aumento de 20x).

DISCUSSÃO

As avermectinas têm se mostrado excelentes ferramentas farmacológicas no tratamento e controle de endo e ectoparasitoses, exercendo importante papel na economia e produção animal. Os estudos dos efeitos destes fármacos sobre a fisiologia reprodutiva em machos são escassos. Alguns trabalhos mostram não haver modificação nos parâmetros reprodutivos (SCHODER *et al.*, 1986; DAURIO *et al.*, 1987). Os dados de SALAMA *et al.* (1995) por outro lado, sugerem ação deletéria da abamectina sobre a estrutura espermática, sendo isto portanto foco de grande debate.

Em nosso trabalho fizemos uma análise geral de todos os parâmetros reprodutivos, através de abordagem morfológica e funcional das estruturas envolvidas no processo da reprodução, após tratamento com as diferentes avermectinas abamectina, doramectina e ivermectina.

O testículo e todos os órgãos acessórios analisados não tiveram alteração da sua massa quando comparados ao controle pelo tratamento com avermectinas (Tabela 1). Os valores médios encontrados na avaliação da proporção volumétrica dos túbulos seminíferos dos grupos tratados com avermectinas também não foram diferentes quando comparados aos dos grupo controle (Tabela 5). Da mesma maneira, nenhuma anormalidade ou degeneração celular foi encontrada na avaliação histológica do parênquima testicular dos animais submetidos ao tratamento com avermectinas (Figura 12). Portanto, estes

tecidos por manterem sua integridade física e funcional, nos sugerem que as avermectinas não interferem com o mecanismo de ação dos esteróides sexuais. Outro possível sítio-alvo onde as avermectinas poderiam de alguma forma atuar e modificar sua função seria a hipófise, pois é a glândula responsável pela produção das gonadotrofinas hipofisárias FSH e LH. A hipófise também não teve sua massa comprometida pelo tratamento com avermectinas (Tabela 1). Este achado pode ser explicado pela incapacidade das avermectinas em atravessar a barreira hematoencefálica, devido ao seu alto peso molecular. Dessa forma, a hipófise só poderia ter sua função alterada por estes fármacos em caso de lesão, distúrbio ou malfuncionamento desta barreira.

Os principais hormônios produzidos nos testículos são o esteróide testosterona, pelas células de Leydig, e o polipeptídeo inibina, pelas células de Sertoli. A síntese destes hormônios é regulada pelas gonadotrofinas hipofisárias LH e FSH, respectivamente, que são hormônios glicoproteicos sintetizados e armazenados na adenohipófise e desempenham papel fundamental na função reprodutiva por estimular a gametogênese e a esteroidogênese. A regulação das gonadotrofinas hipofisárias é efetuada através da liberação pulsátil de um neurohormônio hipotalâmico, o hormônio liberador de gonadotrofinas (GANONG, 1999). Este ao ser liberado no sistema vascular porta-hipotalâmico-hipofisário, estimula a hipófise a liberar LH e FSH. O LH, ao ligar-se ao seu receptor nas células de Leydig, induz aumento na concentração intracelular de Adenosina Monofosfato cíclica (AMPc), que atua como segundo mensageiro e o evento biológico produzido é a estimulação da síntese e liberação de testosterona. A

testosterona é um hormônio de ação androgênica, anabolizante proteico e sua concentração plasmática em machos é relativamente alta durante três períodos da vida: no período de desenvolvimento embrionário; no período neonatal; e na fase adulta. A testosterona é responsável pela manutenção da espermatogênese, do funcionamento das glândulas sexuais acessórias e do desenvolvimento das características sexuais secundárias, incluindo a libido. O FSH nas células de Sertoli, também via AMPc, induz a secreção e liberação de inibina e da proteína que se liga a andrógenos (ABP - "androgen-binding protein"). A inibina retro-age inibindo preferencialmente a produção e secreção de FSH. A testosterona liga-se à ABP, presente no fluido tubular, assegurando dessa maneira a manutenção de um alto e estável suprimento de testosterona neste fluido, fundamental para o processo de espermatogênese (RUCKEBUSCH *et al.*, 1991; GANONG, 1999).

O tratamento com as diferentes avermectinas estudadas não modificou as concentrações hormonais circulantes de testosterona, LH e FSH, em todos os períodos estudados (Figuras 6, 7 e 8), sugerindo não haver nenhuma alteração no eixo hipotálamo-hipófise-gônadas pelo tratamento. A responsividade da gônada foi avaliada pela incubação do parênquima testicular, onde não foi observado também qualquer alteração (Tabela 2). Assim, os resultados *in vivo* e *in vitro* mostram que a funcionalidade das células de Leydig não foi afetada pelo tratamento com avermectinas.

O epidídimo é o órgão onde os espermatozóides são submetidos à maturação e estocagem antes da ejaculação (GANONG, 1999). No rato, assim como nas outras espécies de mamíferos, inclusive o homem, os espermatozóides

só adquirem a capacidade para fertilização após permanecerem um determinado período na porção proximal da cauda do epidídimo. Coletivamente, as mudanças bioquímicas que ocorrem nos espermatozóides durante seu trânsito pela cauda proximal do epidídimo, aumentam a velocidade e motilidade espermática progressiva e conferem aos espermatozóides a habilidade em fertilizar um oócito maduro (KEMPINAS *et al.*, 1998b). O vigor e a motilidade espermática individual são importantes parâmetros reprodutivos, pois refletem a viabilidade e a capacidade de reprodução, havendo correlação direta destes parâmetros com a fertilidade (OTT, 1986; CHAPIN e HEINDEL, 1993). Em nosso estudo, avaliamos a motilidade individual progressiva e o vigor de espermatozóides recolhidos diretamente da cauda do epidídimo (Tabela 3). Nossos resultados mostram que o tratamento com as diferentes avermectinas estudadas não modificou os parâmetros acima citados.

A análise da morfologia espermática possibilita a observação da existência de anormalidades espermáticas estruturais. Assim, como o vigor e a motilidade individual, a morfologia espermática está relacionada com a fertilidade. OTT (1986) sugere que o exame da morfologia espermática é melhor avaliado com o uso de microscopia de contraste de fase. O autor justifica que certos tipos de anormalidades espermáticas não podem ser detectadas sob microscopia ótica comum. SCHODER *et al.* (1986) e DAURIO *et al.* (1987) em estudos utilizando ivermectina, mostraram a ausência de defeitos qualitativos nos espermatozóides de carneiros e cães da raça "Beagle". SALAMA *et al.* (1995) por outro lado, em estudo com camundongos, mostraram vários tipos de anormalidades

segura quanto a não promover modificações na expressão proteica do conteúdo epididimário. Assim, não podemos corroborar o achado de SALAMA *et al.* (1995), pois a análise por SDS-PAGE não indicou nenhuma modificação no padrão proteico. Se o sistema de reparação enzimática estivesse com problemas, como sugerido pelos autores, seguramente observaríamos uma maior ou menor expressão proteica.

A glicose é o substrato energético preferencial para o Sistema Nervoso. Em condições normais, provê 90% da energia necessária para a manutenção do gradiente iônico da membrana celular e para a transmissão elétrica de impulsos, mantendo um suprimento estável de Adenosina Trifosfato (ATP) sob condições aeróbicas e anaeróbicas (BURANT *et al.*, 1991; CLARKE e SOKOLOFF, 1999; GANONG, 1999). A glicose também é a fonte de vários metabólitos para o organismo de mamíferos. O depósito de glicose na forma de glicogênio hepático permite que a sua concentração plasmática seja mantida constante, mesmo nos períodos inter-refeições, através da glicogenólise. O estoque de glicose como glicogênio muscular representa a fonte primária de energia para a musculatura esquelética durante a atividade física. A glicose também faz parte de macromoléculas, incluindo glicoproteínas, proteoglicanos, glicolipídios e ácidos nucleicos (BURANT *et al.*, 1991). Além disso, a glicose é o principal precursor para a produção de GABA *in vivo* (OLSEN e DeLOREY, 1999). Devido aos diferentes papéis desempenhados pela glicose, defeitos na sua captação ou no seu metabolismo podem levar a alterações notáveis nas funções celulares, resultando em morbidade severa e mortalidade (BURANT *et al.*, 1991). O

tratamento com avermectinas não provocou nenhuma alteração significativa na glicemia (Figura 5).

Um dado muito interessante obtido em nosso trabalho é o de ganho de massa corporal com o tratamento com a ivermectina. Os animais de todos os grupos estudados, tratados com abamectina, doramectina, ivermectina e controle, mostraram incremento da massa corporal ao longo do estudo, porém no grupo tratado com ivermectina houve ganho de massa corporal estatisticamente diferente quando comparado ao do grupo controle e ao dos demais grupos tratados, sem que houvesse modificação da ingestão alimentar. Assim, a explicação de incremento da massa corporal por aumento da ingestão alimentar pode ser descartada. Uma outra explicação a ser aventada seria a do papel parasiticida da ivermectinas. Não acreditamos nesta hipótese, pois os animais utilizados neste estudo vieram do biotério desta Universidade, sendo isentos de quaisquer tipos de doenças ou infecções bacterianas, viróticas e parasitárias, pois são realizadas inspeções semanais para assegurar a saúde dos animais. Desta forma, o mecanismo pelo qual houve ganho de massa corporal promovido pela ivermectina ainda é desconhecido.

CONCLUSÃO

Nossos dados trazem a contribuição de confirmar o alto grau de segurança das avermectinas estudadas no campo da reprodução de machos. Não encontramos nenhuma mudança qualitativa e quantitativa ligada às características reprodutivas referentes às funções testiculares e epididimária com o uso das avermectinas (abamectina, doramectina e ivermectina). Analisamos dados referentes à motilidade, vigor e morfologia espermática, concentrações hormonais séricas de FSH, LH e testosterona, responsividade do parênquima testicular incubado, concentrações séricas de glicose, expressões moleculares do conteúdo proteico espermático recolhido da cauda epididimária e incremento da massa corporal, onde não foi observado qualquer alteração destes parâmetros. Nossos resultados permitem sugerir que se as avermectinas forem usadas na dose recomendada não acarretam em nenhum problema reprodutivo em machos mamíferos e, embora a avaliação de ganho de massa corporal não fizesse parte do objetivo inicialmente proposto, observamos que os animais mostraram incremento da massa corporal sem aumentar a ingestão alimentar, a partir da 3ª semana após tratamento com a ivermectina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIOSE, A.; JONES, B.R. Reduction in Incidence of Optic Nerve Disease with Annual Ivermectin to Control Onchocerciasis. **Lancet**, Boston, v. 341, p. 130-134, 1993.
- AHRENS, F.A. Avermectinas. In: AHRENS, F.A. (ed.). **Farmacologia Veterinária**, Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. p. 292; 304.
- ALBERT, J.; LINGLE, D.H.; MARDER, E.; O'NEIL, M.B. A GABA-Activated Chloride-conductance not Blocked by Picrotoxin on Spiny Lobster Neuromuscular Preparations. **Brit. J. Pharmacol.**, Basingstone, v. 87, p. 771-779, 1986.
- ALLEN, E. Studies on Cell Division in the Albino Rat. **J. Morphol.**, New York, v. 31, n. 1, p. 133-185, 1919.
- AMES, B.N.; McCANN, J. YAMASAKI, E. Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 31, p. 347-364, 1975.
- ARENA, J.P.; LIU, K.K.; PARESS, P.S.; CULLY, D.F. Avermectin-sensitive Chloride Currents Induced by *Caenorhabditis elegans* RNA in *Xenopus* Oocytes. **Mol. Pharmacol.**, Baltimore, v. 40, p. 368-374, 1991.

- ARENA, J.P.; LIU, K.K.; PARESS, P.S.; FRAZIER, E.G.; CULLY, D.F.; MROZIK, H.; SCHAEFFER, J.M. The Mechanism of Action of Avermectins in *Caenorhabditis elegans*: Correlations between Activation of Glutamate-Sensitive Chloride Current Membrane Binding, and Biological Activity. **J. Parasitol.**, Lawrence, v. 81, p. 286-294, 1995.
- ARENA, J.P.; LIU, K.K.; PARESS, P.S.; SCHAEFFER, J.M.; CULLY, D.F. Expression of a Glutamate Activated Chloride Current in *Xenopus* Oocytes Injected with *Caenorhabditis elegans* RNA; Evidence for Modulation by Avermectin. **Mol. Brain Res.**, Amsterdam, v. 15, p. 339-348, 1992.
- ASQUITH, R.L.; LANE, T.J.; PLUE, R.E.; SEWARD, R.L.; KIVIPELTO, J. The Bioavailability of Ivermectin in Horses when Administered in a Liquid Formulation by Nasogastric Intubation Versus in an Oral Paste. **Que. Vet. Sci.**, v. 7, p. 28-30, 1987.
- AYRES, M.C.C.; ALMEIDA, M.A.O. Agentes Antinematódeos: Avermectinas. In: SPINOSA, H.S.; GORNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. (eds.), **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1996. p. 423-424.
- BETZ, L.; GOLDSTEIN, G.N. Developmental Changes in Metabolism and Transport Properties of Capillaries Isolated from Rat Brain. **J. Physiol.**, Cambridge, v. 312, p. 365-376, 1981.
- BLOM, E. The Ultrastructure of Some Characteristics Sperm Defects and a Proposal of a New Classification of the Bull Spermogram. **Nord. Vet. Med.**, Vanlose, v. 25, n. 7, p. 383-391, 1973.

BOHR, V.; MOLLGARD, K. Tight Junctions in Human Fetal Choroid Plexus Visualized by Freeze-etching. **Brain Res.**, Amsterdam, v. 81, p. 314-318, 1974.

BOLENDER, R.P. Stereology and its Uses in Cell Biology. Technique for Studying Testicular Cell Biology. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, New York, v. 1, p. 1-13, 1982.

BURANT, C.F.; SIVITZ, W.I.; FUKUMOTO, H.; KAYANO, T.; NAGAMATSU, S.; SEINO, S.; PESSIN, J.E.; BELL, G.I. Mammalian Glucose Transporters: Structure and Molecular Regulation. **Recent. Progr. Horm. Res.**, San Diego, v. 47, p. 349-388, 1991.

BURG, R.W.; MILLER, B.M.; BAKER, E.E.; BIRNBAUM, J.; CURRIE, J.A.; HARMAN, R.; KONG, V.L.; OMURA, S. The Action of Avermectin on Identified Central Neurons from *Helix* and its Interaction with Acetylcholine and Gamma-aminobutyric Acid Responses. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington - DC, v. 15, p. 361-367, 1979.

CAMPBELL, W.C.; BENZ, G.W. Ivermectin: a Review of Efficacy and Safety. **J. Vet. Pharmacol. Ther.**, Oxford, v. 7, p. 1-16, 1984.

CAMPBELL, W.C.; FISHER, M.H.; STAPLEY, E.O.; AL-BERS-SCHONBERG, G.; JACOB, T.A. Ivermectin, a Potent New Antiparasitic Agent. **Science**, Washington - DC, v. 221, p. 823-828, 1983.

CAPRONI, L. **Laboratórios Pfizer Ltda** - Divisão Agropecuária: capron@pfizer.com, 26/11/1999.

CHABALA, J.C.; MROZIK, H.; TOLMON, R.L.; ESKOLA, P.; LUSI, A.; PETERSON, L.H.; WOODS, M.F.; FISHER, M.H. Ivermectin, A New Broad-Spectrum Antiparasitic Agent. **J. Med. Chem.**, Washington - DC, v. 23, p. 1134-1136, 1980.

- CHAPIN, R.E.; HEINDEL, J.J. Methods for Evaluation of Rat Epididymal Sperm Morphology. In: **METHODS in toxicology: Male Reproductive System**. Los Angeles: Academic Press, 1993.
- CLARKE, D.D.; SOKOLOFF, L. Circulation and Energy Metabolism of the Brain. In: In: SIEGEL, G.J.; AGRANOFF, B.W.; ALBERS, R.W.; FISHER, S.K.; UHLER, M.D. (eds.). **Basic Neurochemistry – Molecular, Cellular and Medical Aspects**. New York: Lippincott Raven, 1999. p. 656- 669.
- CLIVE, D.; SPECTOR, J.A.S.F. Laboratory Procedure for Assessing Specific Locus Mutations at the TK Locus in Cultured L5178Y Mouse Lymphoma Cells. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 31, p. 17-29, 1975.
- CLIVE, D; FLAMM, W.; MACHESKO, M.; BERNHEIM, J. A Mutational Assay System Using the Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 16, p. 77-87, 1972.
- COOPER, J.R. Amino Acids. In: COOPER, J.R.; BLOOM, F.R.; ROTH, R.H. (eds). **The Biochemical Basis of Neuropharmacology**. Oxford: Oxford University Press, 1982. p.250.
- CULLY, D.F.; VASSILATIS, D.K.; LIU, K.K.; PARESS, P.S.; VAN DER PLOEG, L.H.T.; SCHAEFFER, J.M.; ARENA, J.P. Cloning of na Avermectin-Sensitive Glutamate-Gated Chloride Channel from *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, London, v. 371, p. 707-711, 1994.
- DAURIO, C.P.; GILMAN, M.R.; PULLIAM, J.D.; SEWARD, R.L. Reproductive Evaluation of Male Beagles and the safety of Ivermectin. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v. 48, n. 12, p. 1755-1760, 1987.

- DINGLELINE, R.; MCBAIN, C.J. Glutamate and Aspartate. In: SIEGEL, G.J.; AGRANOFF, B.W.; ALBERS, R.W.; FISHER, S.K.; UHLER, M.D. (eds.). **Basic Neurochemistry – Molecular, Cellular and Medical Aspects**. New York: Lippincott Raven, 1999. p. 315-333.
- DUCE, I.R.; SCOTT, R.H. Actions of Dihydroavermectin B_{1a} on Insect Muscle. **Brit. J. Pharmacol.**, Basingstone, v. 85, p. 395-401, 1985.
- DUCE, I.R.; SCOTT, R.H. GABA Sensitivity in the Distal Bundles of the Locust Extensor Tibiae Muscle. **J. Physiol.**, Cambridge, v. 343, p. 32, 1983.
- DYBAS, R.A.; GREEN, A.S.J. Avermectins: their Chemistry and Pesticidal Activity. **British Crop protection Conference, Pests and Diseases**, London, v. 9b-3, p. 947-954, 1984.
- EGERTON, J.R.; BIRNBAUM, J.; BLAIR, L.S.; CHABALA, J.C.; CONROY, J.; FISHER, M.H.; MROZIK, H.; OSTLIND, D.A.; WILKINS, C.A.; CAMPELL, W.C. 22,23-Dihydroavermectin B₁, A New Broad-spectrum Antiparasitic Agent. **Bras. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v. 136, p. 88-97, 1980.
- EGERTON, J.R.; OSTLIND, D.A.; BLAIR, L.S.; EARY, C.H.; SUHAYDA, D.; CIFELLI, S.; RIEK, R.F.; CAMPELL, W.C. Avermectins, New Family of Potent Anthelmintic Agents: Efficacy of the B_{1b} Component. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington - DC, v. 15, p. 372-378, 1979.
- ELIAS, H.; HENNIG, A.; SCHWARTZ, D.E. Stereology: Applications to Biomedical Research. **Physiol. Rev.**, Bethesda, v. 51, p. 158-200, 1971.

- ELLIS, C.; NATHWANI, B.; MORRICE, N.; PARKER, P.; EVANS, F.J.; AITKEN, A.
Ivermectin: na Inhibitor of Protein Kinase C-: A Potential Target Enzyme for
Onchocerciases Chemotherapy. **Brit. J. Pharmacol.**, Basinstone, v. 91, p. 22,
1987.
- FASSLER, P.E.; TRANQUILLI, W.J.; PAUL, A.J.; SOLL, M.D.; DIPIETRO, J.A.;
TODD, K.S. Evaluation of the Safety of Ivermectin Administered in a Beef-Based
Formulation to Ivermectin-Sensitive Collies. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**,
Schaumburg, v. 199, n. 4, p. 457-460, 1991.
- FINK, D.W.; PORRAS, A.G. Farmacokinetics of Ivermectin in Animals and Humans.
In: CAMPBELL, W.C. (ed.). **Ivermectin and Abamectin**. New York: Springer-
Verlag, 1989. p.113-130.
- FISHER, M.H.; MROZIK, H. The Chemistry and Pharmacology of the Ivermectins.
Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., Palo Alto, v. 32, p. 537-553, 1992.
- FORBES, A.B. A Review of Regional and Temporal use of Avermectins in Cattle and
Horses Worldwide. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v. 48, n. 1-4, p. 19-28, 1993.
- GANONG, W.F. **REVIEW of Medical Prysiology**. Stamford: Appleton & Lange, 1999.
p. 393-432.
- GARFIN, D.E. One-Dimensional Gel Eletrophoresis. **Methods Enzymol.**, San Diego,
v. 182, p. 425-41, 1990.
- GOA, K.L.; MCTAVISH, D.; CLISSOLD, S.P. Ivermectin. A Review of its Antifilarial
Activity, Pharmacokinetic Properties and Clinical Efficacy in Onchocerciasis.
Drugs, Auckland, v. 42, p. 640-658, 1991.

- GOUDIE, A.C.; EVANS, N.A.; GRATION, B.F.; BISHOP, B.F.; GIBSON, S.P.; HOLDOM, K.S.; KAYE, B.; WICKS, S.R.; LEWIS, D.; WEATHERLEY, A.J.; BRUCE, C.I.; HERBERT, A.; SEYMOUR, D.J. Doramectin – A Potent Novel Endectocide. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v. 49, p. 5-15, 1993.
- GREENE, B.M., TAYLOR, H.R.; CUPP, E.W.; MURPHY, R.P.; WHITE, A.T.; AZIZ, M.A.; SCHULZ-KEY, H.; D'ANNA, S.A.; NEWLAND, H.S.; GOLDSCHMIDT, L.P.; AUER, C.; HANSOM, A.P.; FREEMAN, S.V.; REBER, E.W.; WILLIAMS, P.N. Comparison of Ivermectin and Diethylcarbamazine in the Treatment of Onchocerciasis. **New Eng. J. Med.**, Boston, v. 313, p. 133-138, 1995.
- GROVER, I.S.; MALHI, P.K. Genotoxic Effects of some Organophosphorus Pesticides. III. *In Vivo* Chromosomal Aberration Bioassay in Root Meristems of *Allium* and *Hordeum*. **Cytol.**, St. Petesburg, v. 53, p. 181-191, 1988.
- HAYES, W.J.; LAWS, E.R. Classes of Pesticides. In: **HANDBOOK of Pesticide Toxicology.**, New York: Academic Press, 1990. v. 3.
- ISHIKO, J.; INAGAKE, C.; TAKAORI, S. Effects of Avermectin B_{1a} and Picrotoxin on Striatal Release of Dopamine with Reference to Replacement of Extracellular Chloride with Nitrate. **Neuropharmacology**, Exeter, v. 24, p. 1147-1154, 1985.
- JONES, R.M.; LOGAN, N.B.; WEATHERLY, A.J.; LITTLE, A.S.; SMPHERS, C.D. Activity of Doramectin Against Nematode Endoparasites of Cattle. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v. 49, p. 27-37, 1993.
- KEMPINAS, W.G.; LAMANO-CARVALHO, T.L. A Method for Estimating the Concentration of Spermatozoa in the Rat Cauda Epididymis. **Lab. Anim.**, London, v. 22, p. 154-156, 1988.

- KEMPINAS, W.G.; SUAREZ, J.D.; ROBERTS, N.L.; STRADER, L.; FERRELL, J; GOLDMAN, J.M.; KLINEFELTER, G.R. Rat Epididymal Sperm Quantity, Quality, and Transit Time after Guanethidine-Induced Sympathectomy. **Biol. Reprod.**, Madison, v. 59, n. 4, p. 890-896, 1998a.
- KEMPINAS, W.G.; SUAREZ, J.D.; ROBERTS, N.L.; STRADER, L.; FERRELL, J; GOLDMAN, J.M.; NAROTSKY, M.G.; PERREAULT, S.D.; EVERSON, D.P.; RICKER, D.D.; KLINEFELTER, G.R. Fertility of Rat Epididymal Sperm after Chemical and Surgically Induced Sympathectomy. **Biol. Reprod.**, Madison, v. 59, n. 4, p. 897-904, 1998b.
- KOJIMA, K.; YAMAMOTO, K.; NAKANISHI, Y. determination of 22,23-Dihydroavermectin B_{1a} in Dog Plasma Using Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v. 413, p. 326-331, 1987.
- LANKAS, G.R.; GORDON, L.R. Toxicology. In: CAMPBELL, W.C. (ed.). **Ivermectin and Abamectin**. New York: Springer-Verlag, 1989. p.89-112.
- LASOTA, J.A.; DYBAS, R.A. Avermectins, a Novel Class of Compounds: Implications for Use in Arthropod Pest Control. **Ann. Vet. Entomol.**, v. 36, p. 91-117, 1991.
- LEANING, W.H.D.; GUERRERO, J. The Economic Impact of Parasitism in Cattle. **MSD-AGVET Symposium - XXIII WVC**, Montreal, 1987.
- LEVIS, D.T.; MERCHANT, S.R.; NEER, T.M. Ivermectin Toxicosis in a Kitten. **JAVMA**, Schaumburg, v. 205, p. 584-586, 1994.

- LOGAN, N.B.; WEATHERLY, A.J.; PHILLIPS, F.E.; WILKINS, C.P.; SHANKS, D.J. Spectrum of Activity of Doramectin Against Cattle Mites and Lice. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v. 49, p. 67-73, 1993.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Proteins Measurements with the Folin Phenol Reagent. **J.Biol.Chem.**, Bethesda, v. 193, p. 265-275, 1951.
- MANTEL, N.; TUKEY, J.W.; CIMINERA, J.L.; HEYSE, J.F. Tumorigenicity Assays, Including Use of the Jackknife. **Biom. J.**, Berlin, v. 24, p. 579-596, 1982.
- MELLIN, T.N.; BUSCH, R.D.; WANG, C.C. Postsynaptic Inhibition of Invertebrate Neuromuscular Transmission by Avermectin B_{1a}. **Neuropharmacology**, Exeter, v. 22, p. 89-96, 1983.
- MICHALANY, J. Operações Fundamentais da Técnica Histológica. In:____. **Técnica Histológica em Anatomia Patológica**. São Paulo: E.P.U., 1980. P. 22-31.
- MILLER, T.W.; CHAIET, L.; COLE, D.J.; FLOR, J.E.; GOEGELMAN, R.T.; GULLO, V.P.; JOSHUA, H.; KEMPF, A.J.; KRELWITZ, W.R.; MONAGHAM, R.L.; ORMOND, R.E.; WILSON, K.E.; ALBERS-SCHONBERG, G.; PUTTER, I. Avermectins, A New Family of Potent Anthelmintic Agents: Isolation and Chromatographic Properties. **Antimicrob. Agents Chemoter.**, Washington - DC, v. 15, p. 368-371, 1979.
- NAQUIRA, C.; JIMENEZ, G.; GUERRA, J.G.; BERNAL, R.; NALIN, D.R.; NEU, D.; AZIZ, M. Ivermectin for Human Strongyloidiasis and other Intestinal Helminths. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Northbrook, v. 40, n. 3, p. 304-309, 1989.

- NICHOLSON, R.; ROBINSON, P.S.; PALMER, P.J.; CASIDA, J.E. Ivermectin-stimulated Release of neurotransmitter in the Insect Central Nervous System: Modulation by External Chloride and Inhibition by a Novel Trioxabicyclooctane and Two Polychlorocycloalkane Insecticides. **Neurotox'88**, 1988, p. 14. Resumo.
- OLSEN, R.W.; DELORY, T.M. GABA and Glycine. In: SIEGEL, G.J.; AGRANOFF, B.W.; ALBERS, R.W.; FISHER, S.K.; UHLER, M.D. (eds.). **Basic Neurochemistry – Molecular, Cellular and Medical Aspects**. New York: Lippincott Raven, 1999. p. 335-346.
- ONISHI, J.C.; MILLER, T.W. The Lack of Antifungal Activity by Avermectin B_{1a}. **J. Antibiot.**, Tokyo, v. 38, p. 1568-1572, 1985.
- OTT, R.S. Breeding Soundness Examination of Bulls. In: MORROW, D.A. (ed.) **CURRENT Therapy in Theriogenology - Diagnosis, Treatment and Prevention of Reproductive Diseases in Small and Large Animal**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1986. p. 125-136.
- PAUL, S.M.; SKOLNICK, P.; ZATZ, M. Avermectin B_{1a}: an Irreversible Activator of the Gamma-aminobutyric Acid-benzodiazepine-chloride-ionophore Receptor Complex. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Orlando, v. 96, p. 632-638, 1980.
- PONG, S-S; DeHAVEN, R.; WANG, C.C. Stimulation of Benzodiazepine Binding to Rat Brain Membranes and Solubilized Receptor Complex by Avermectin B_{1a} and GABA. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 646, p. 143-149, 1981.
- PONG, S-S; WANG, C.C. Avermectin B_{1a} Modulation of Gamma-aminobutyric Acid Receptors in Rat Brain Membranes. **J. Neurochem.**, Hagerstown, v. 38, p. 375-379, 1982.

- PONG, S-S; WANG, C.C.; FRITZ, L.C. Studies on the Mechanism of Action of Avermectin B_{1a} : Stimulation of Release of Gamma-aminobutyric Acid from Brain Synaptosomes. **J. Neurochem.**, Hagerstown, v. 34, p. 351-358, 1980.
- PULLIAM, J.D.; PRESTON, J.M. Safety of Ivermectin in Target Animals. In: CAMPBELL, W.C. (ed.). **Ivermectin and Abamectin**. New York: Springer-Verlag, 1989. p.149-161.
- PUTTER, O.; MACCONNELL, J.G.; PREISER, F.A.; HAIDRI, A.A.; RISTICH, S.S.; DYBAS, R.A. Avermectins: Novel Inceticides, Acaricides and Nematocides from a Soil Microorganism. **Exp. Parasitol.**, Orlando, v. 37, p. 963-964, 1981.
- RHORER, S.P.; ARENA, J.P. Ivermectin Interactions with in Invertebrate Ion Channels. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; MOLINOFF, P.B.; RUDDON, R.W.; GILMAN, A.G. (eds). **GOODMAN & GILMAN'S - The Pharmacological Basis of Therapeutics**. New York: McGraw-Hill, 1996.
- ROBERTSON, B. Actions of Anaesthetics and Avermectin on GABA_A Chloride Channels in Mammalian Dorsal Root Ganglion Neurones. **Br. J. Pharmacol.**, v. 98, n. 1, p. 167-176, 1989.
- RUCKEBUSCH, Y.; PHANEUF, L-P.; DUNLOP, R. **Physiology of Small and Large Animals**. Philadelphia, B.C. Decker, 1991, p. 508-510; 556-562.
- SALAMA, S.A.; FAHMI, A.I.; ABO EL-GHAR, G.E.S. Chromosomal Aberrations and Spermhead Abnormalities Induced by Abamectin (Avermectin B₁) and its Degradates in Male Swiss Albino Mice. **Cytologia**, Tokyo, v. 60, p. 411-417, 1995.
- SANI, B.P.; VAID, A. Specific Interaction of Ivermectin with Retinol-binding Protein from Filarial Parasites. **Biochem. J.**, London, v. 249, p. 929-932, 1988.

SCHAEFFER, J.M.; HAINES, H.W. Avermectin Binding in *Caenorhabditis elegans*: a Two-State Model for the Avermectin Binding Site. **Biochem. Pharmacol.**, Tarrytown, v. 38, p. 2329-2338, 1989.

SCHAEFFER, J.M.; BERGSTROM, A.R. Identification of Gamm-aminobutyric Acid Binding Sites in *Caenorhabditis elegans*. **Life Sci.**, Tarrytown, v. 43, p. 1701-1706, 1988.

SCHRODER, J.; SWAN, G.E.; BARRICK, R.A.; PULLIAM, J.D. Effect of Ivermectin on the Reproductive Potential of Breeding Rams. **J. S. Afr. Vet. Assoc.**, Pretoria, v. 57, n. 4, p. 211-213, 1986.

SCHWARTZ, R.D.; SUDAK, P.D.; PAUL, S.M. GABA- and Bartiuate-mediated Chloride Uptake in Rat Brain Synaptoneurosome: Evidence for a Rapid Desensitization of the GABA Receptor-coupled Chloride Ion Channel. **Molec. Pharmacol.**, Baltimore, v. 30, p. 419-426, 1986.

SHOOP, W.L.; MROZIK, H.; FISHER, M.H. Structure and Activity of Avermectins and Milbemycins in Animal Health. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v. 59, p. 139-156, 1995.

SIEGHART, W.; EICHINGER, A.; RIEDERER, P.; JELLINGER, K. Comparison of Benzodiazepine Receptor Binding in Membranes from Human or Rat Brain. **Neuropharmacology**, Exeter, v. 24, p. 751-760, 1985.

SMITH, T.E. Molecular Cell Biology. In: DEVLIN, T.M. (ed.). **Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations**. New York: Wiley-Liss, 1997. p. 931.

- SODERLAUD, D.M.; ADAMS, P.M.; BLOOMQUIST, J.R. Differences in the Action of Avermectin B_{1a} on the GABA_A Receptor Complex of Mouse and Rat. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Orlando, v. 146, p. 692-698, 1987.
- SUPAVILAI, P.; KAROBATH, M. *In Vitro* Modulation by Avermectin B_{1a} of the GABA/Benzodiazepine Receptor Complex of Rat Cerebellum. **J. Neurochem.**, Hagerstown, v. 36, p. 798-805, 1981.
- TANAKA, K.; MATSUMURA, F. Action of Avermectin B_{1a} on the Leg Muscles and Nervous System of the American Cockroach. **Pestic. Biochem. Physiol.**, Orlando, v. 24, p. 124-135, 1985.
- TRINDER, R. Determination of Glucose in Blood Using Glucose Oxidase with Alternative Oxygen Acceptor. **Ann. Clin. Biochem.**, London, v. 6, p. 24-27, 1969.
- TUKEY, J.W.; CIMINERA, J.L.; HEYSE, J.F. Testing the Statistical Certainty of a Response to Increasing Doses of a Drug. **Biometrics**, Washington, v. 41, p. 295-301, 1985.
- TURNER, M.J.; SCHAEFFER, J.M. Mode of Action of Ivermectin. In: CAMPBELL, W.C. (ed.). **Ivermectin and Abamectin**. New York: Springer-Verlag, 1989. p. 73-88.
- WHITWORTH, J. Treatment of Onchocerciasis with Ivermectin in Sierra Leone. **Parasitol. Today**, Oxon, v. 8, p. 138-140, 1992.
- WICKS, S.R.; KAYE, B.; WEATHERLEY, A.J.; LEWIS, D.; DAVIDSON, E.; GIBSON, S.P.; SMITH, D.G. Effect of Formulation on the Pharmacokinetics and Efficacy of Doramectin. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v. 49, p. 17-26, 1993.

WILKINS, R.J.; HART, R.W. Preferential DNA Repair in Human Cells. **Nature**, London, v. 247, p. 35-36, 1973.

WILLIAMS, G.M.; LASPIA, M.F.; DUNKEL, V.C. Reliability of the Hepatocyte Primary Culture/DNA Repair Test in Testing Coded Carcinogens and Non-carcinogens. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 97, p. 359-370, 1982.